



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM N-METIL-D-
ASPARTATO (NMDA) EM CONVULSÕES INDUZIDAS POR ÁCIDO
QUINOLÍNICO EM CAMUNDONGOS**

Samuel Vandresen Filho

Orientadora: Prof^a. Dr^a Carla Inês Tasca

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Carina Rodrigues Boeck

Colaborador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré

Florianópolis, Fevereiro de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO COM N-METIL-D-
ASPARTATO (NMDA) EM CONVULSÕES INDUZIDAS POR ÁCIDO
QUINOLÍNICO EM CAMUNDONGOS**

Samuel Vandresen Filho

Orientadora: Prof^a. Dr^a Carla Inês Tasca

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Carina Rodrigues Boeck

Colaborador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre.**

Florianópolis, Fevereiro de 2007.

*“Não deixaremos de explorar, e ao
término da nossa exploração
deveremos chegar ao ponto de
partida e conhecer este lugar pela
primeira vez”*

Thomas Stearns Eliot

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Samuel e Irene pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Agradeço à minha orientadora Dra. Carla I. Tasca, pela oportunidade, pelos ensinamentos científicos, pela compreensão, paciência e motivação que tanto me ajudaram durante o mestrado.

Agradeço a minha co-orientadora Dra. Carina Rodrigues Boeck pela motivação e ânimo, e também pelos merecidos “puxões de orelha” que me ajudaram na concretização deste trabalho.

Ao Dr. Alcir Luiz Dafré, pois foi através da colaboração com seu laboratório que conseguimos realizar parte importante deste trabalho.

À minha querida Elise pelo amor, apoio e dedicação em todos os momentos.

Ao povo do laboratório: Scheyla, Bruno, Tharine, Helena, Cristiane, Ellen, Dênis, Simone, Marina, Thais, Claudia, Manuela, Denis, Wagner.

Aos meus amigos e amigas de mestrado e doutorado, especialmente ao Fábio, Eduardo, Ana Paula, Thais e Kelson.

Agradeço ao Dr. Reynaldo Takahashi por permitir a utilização do aparelho estereotático.

À Dra. Andréa Gonçalves Trentin pelo empréstimo de equipamentos.

Ao Dr. Rodrigo Bainy Leal e Dr. Nelson Gabilán, pelo auxílio técnico e amizade.

Ao Nivaldo da secretaria do PPG pela sua dedicação aos alunos.

A todos os amigos e amigas, pelos atos, sugestões e críticas que me ajudaram nesta jornada.

A todos os professores do curso, pela amizade e pelo prazer em ensinar.

Ao CNPq, pelo financiamento da bolsa de estudo.

Agradeço a todos que algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Transmissão glutamatérgica.....	1
1.2. Excitotoxicidade e Morte Celular.....	5
1.3. Pré-condicionamento.....	10
1.4. Glutathione.....	12
1.5. Ácido Quinolínico.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Materiais.....	19
3.2. Equipamentos.....	19
3.3. Animais.....	20

3.4. Procedimento Cirúrgico	20
3.5. Tratamento com NMDA.....	20
3.6.. Convulsões com Ácido Quinolínico.....	21
3.7. Separação de Proteínas por Eletroforese (SDS-PAGE).....	22
3.7.1. Separação de Proteínas por Eletroforese.....	22
3.7.2. Eletrotransferência e Imunodeteção de proteínas (Western blot).....	22
3.8. Análise da Fragmentação de DNA.....	23
3.9. Avaliação dos níveis de Glutathione total (GSH-t).....	24
3.10. Ensaio Enzimático.....	25
3.10.1. Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx).....	25
3.10.2. Avaliação da atividade da Glutathione S-Transferase (GST).....	25
3.10.3. Avaliação da atividade da Glutathione Redutase (GR).....	26
3.10.4. Avaliação da atividade da Glicose 6-fosfato Desidrogenase (G6PDH).....	27
3.11. Dosagem de Proteína.....	27
3.12. Análise Estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Análise da Fragmentação de DNA.....	28
4.2. Imunodeteção da Caspase-3.....	34
4.3. Avaliação da Glutathione Total e da Atividade de suas Enzimas Relacionadas.....	37

5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura esquemática da transmissão glutamatérgica.....	3
Figura 2. Representação esquemática da apoptose e suas vias clássicas.....	6
Figura 3. Esquema ilustrativo das funções anti-oxidantes da glutathione.....	14
Figura.4. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA do córtex cerebral de camundongos após tratamento com ácido quinolínico i.c.v.....	29
Figura. 5. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA do hipocampo de camundongos após tratamento com ácido quinolínico i.c.v.....	30
Figura. 6. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA do córtex cerebral de camundongos 48 horas após tratamento com NMDA e/ou ácido quinolínico.....	32
Figura. 7. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA do hipocampo de camundongos 48 horas após tratamento com NMDA e/ou ácido quinolínico.....	33
Figura 8. Imunodeteção da proteína Caspase-3 e de seu fragmento de 17 kDa no córtex cerebral de camundongos tratados com NMDA e/ou ácido quinolínico.....	35

Figura 9. Imunodeteção da proteína Caspase-3 e de seu fragmento de 17 kDa no hipocampo de camundongos tratados com NMDA e/ou ácido quinolínico.....	36
Figura 10. Avaliação dos níveis de glutatona total (GSH-t) no pré-condicionamento com NMDA contra as convulsões induzidas pelo AQ no córtex cerebral e hipocampo de camundongos.....	38
Figura 11. Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx) no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ.....	40
Figura 12. Atividade da Glutaciona S-transferase (GST) no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ.....	42
Figura 13. Atividade da Glutaciona redutase (GR) no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ.....	43
Figura 14. Atividade da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AQ: Ácido Quinolínico

AMPA: α -Amino-3-Hidróxi-5-Metil-4-Isoxazolproprionato

DNA: Ácido desoxiribonucleico

EDTA: Ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GABA: Ácido gama-amino-butírico

GPx: Glutathione Peroxidase

GR: Glutathione Redutase

GSH: Glutathione

GSH-t: Glutathione total

GST: Glutathione S-transferase

G6PDH: Glicose 6-fosfato desidrogenase

i.c.v. : Intra-cerebroventricular

i.p. : Intra-peritoneal

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NQnc: animais tratados com NMDA + QA não convulsionados

NQc: animais tratados com NMDA + QA convulsionados

SDS: duodecil sulfato de sódio

SNC: Sistema Nervoso Central

TBS: tampão tris-salina

TBS-T: tampão tris-salina com Tween-20

Tris: Tris hidroximetil amino metano

RESUMO

O pré-condicionamento cerebral se refere a um estado de tolerância transitória do tecido nervoso a um estímulo letal evocado por um insulto moderado prévio. O pré-condicionamento pode ser evocado por estímulos físicos ou químicos, como o pré-condicionamento com N-metil-D-aspartato (NMDA). O pré-condicionamento com NMDA pode ser promovido *in vivo* pela administração de uma dose sub-convulsivante de NMDA, com efeito neuroprotetor contra a toxicidade do cainato ou isquemia, além de prevenir convulsões e morte neuronal induzida pelo ácido quinolínico (AQ) em camundongos. O objetivo deste estudo foi avaliar o tipo de morte celular no hipocampo e córtex cerebral induzida pela administração de AQ em camundongos, bem como avaliar os efeitos do pré-condicionamento com NMDA sobre a expressão da caspase-3, fragmentação de DNA e sobre o sistema antioxidante da glutathione (GSH). Os camundongos foram pré-condicionados com NMDA (75 mg/kg, 10 ml/kg i.p) 24 h antes da infusão de AQ (4 µl, 9.2 mM i.c.v.). O AQ não promoveu fragmentação do DNA tanto no córtex cerebral como no hipocampo, sugerindo morte celular por necrose. O pré-condicionamento com NMDA não promoveu alteração na fragmentação do DNA, demonstrando que não possui efeito neurotóxico. O pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ não promoveram alterações na expressão da pró-caspase-3 e da caspase-3. O pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ não alteraram o conteúdo de glutathione total (GSH-t), e a atividade das enzimas glutathione redutase e da glicose 6-fosfato desidrogenase. Contudo, um aumento na atividade da glutathione S-transferase (GST) foi observado no córtex cerebral após o tratamento com NMDA e AQ. Além disso, o pré-condicionamento com

NMDA preveniu a diminuição na atividade da glutathione peroxidase (GPx) induzida pelo AQ no hipocampo, mas não teve efeito sobre a diminuição da atividade da GPx cortical.

ABSTRACT

Brain preconditioning refers to a state of transient brain tissue tolerance to a lethal insult evoked by a prior mild insult. Preconditioning can be evoked by a variety of physical or chemical stimuli, such as chemical preconditioning with N-methyl-D-aspartate (NMDA). NMDA preconditioning can be evoked *in vivo* by a non-convulsant dose of NMDA, and it is known to be neuroprotective against kainate toxicity or ischemia and prevents seizures and neuronal death induced by quinolinic acid (QA) in mice. This study aimed to evaluate the kind of cellular death in cerebral cortex and hippocampus induced by the administration of QA in mice, as well as, to evaluate the effects of NMDA preconditioning in the expression of caspase-3, DNA fragmentation and, its effects in the glutathione scavenger system. Mice were preconditioned by a non-convulsant NMDA dose (75 mg/kg, 10 ml/kg i.p.) 24h before AQ infusion (4 μ l, 9.2 mM i.c.v.). QA did not promote DNA laddering either in the cerebral cortex or in the hippocampus, suggesting cellular death by necrosis. NMDA preconditioning did not promote DNA laddering. NMDA preconditioning and QA infusion did not evoked any alteration in both pro-caspase-3 and capsase-3 active form expression. NMDA preconditioning and QA infusion did not alter GSH content, GR and G6PDH activities, however, an increase in GST activity was observed in the cerebral cortex from mice. Moreover, NMDA pretreatment was able to prevent the QA-induced decrease in hippocampal GPx activity, but it was not effective against the decreased cortical GPx activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transmissão Glutamatérgica

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos e está envolvido no desenvolvimento, sobrevivência neuronal, aprendizado e memória. Os efeitos do glutamato são mediados por receptores ionotrópicos, os quais são canais de cátions, e metabotrópicos que modulam proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G) (DINGLE et al, 1999). Farmacologicamente, os receptores ionotrópicos classificam-se em receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), de α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e de cainato de acordo com a maior seletividade por seus ligantes sintéticos específicos (AHMADIAN et al, 2004).

Evidências demonstram a existência de oito receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) que são subdivididos em três grupos de acordo com dados farmacológicos, mecanismos de transdução do sinal e similaridade na sequência de aminoácidos. O grupo I de mGluR (mGlu1 e mGlu5) estimulam a fosfolipase C, enquanto o grupo II (mGlu2 e mGlu3) e o grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) modulam a atividade da adenilato ciclase (GUBELLINI et al, 2004; SWANSON et al, 2005).

Fisiologicamente, os receptores AMPA e cainato estão relacionados à transmissão sináptica rápida no SNC e são caracterizados pelas rápidas cinéticas de ativação e desativação (POPESCU & AUERBACH, 2004). Os receptores AMPA formam-se de quatro subunidades GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 e são responsáveis pela despolarização inicial do potencial pós-sináptico (STONE & ADDAE, 2002). Evidências demonstram que

a entrada de cálcio pelos receptores AMPA ativa a cálcio-calmodulina quinase II, a qual, por sua vez, fosforila o próprio receptor, o que potencializa a corrente iônica conduzida pelo mesmo, fenômeno esse que tem sido relacionado à potenciação de longa duração (LTP) (XIA & STORM, 2005).

Os receptores de cainato são tetrâmeros formados a partir da associação de cinco tipos de subunidades denominadas GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2. Encontrados no hipocampo, córtex, estriado, cerebelo, amígdala, hipotálamo, medula espinhal e na retina, os receptores de cainato diferenciam-se dos receptores AMPA pela menor corrente conduzida e pela cinética de desativação mais lenta (HUETTNER, 2003). Os receptores de cainato localizados nas células pré-sinápticas estão envolvidos na modulação da liberação de ácido gama-amino-butírico (GABA) e do próprio glutamato em sinaptossomas hipocâmpais. Os receptores de cainato pós-sinápticos são responsáveis por um componente lento e pequeno do potencial excitatório pós-sináptico relacionado a fenômenos de plasticidade de curta e longa duração. Além das funções fisiológicas, a ativação desses receptores através do tratamento com cainato tem sido utilizado como modelo químico da epilepsia do lobo temporal de humanos (LERMA, 2003; MADDEN, 2002).

Dentre os receptores glutamatérgicos, os receptores NMDA são os que possuem a maior afinidade pelo glutamato (WAXMAN et al., 2005). Os receptores NMDA são proteínas heteroméricas compostas da combinação de subunidades NR1 com as subunidades NR2A-D ou NR3A-B (TAKAGI et al., 2003). As subunidades NR1 são constitutivas e promovem a funcionalidade do receptor, enquanto que as subunidades NR2 determinam a especificidade do receptor (SCOTT et al., 2003; WAXMAN et al., 2005). Acredita-se que duas subunidades NR1 se associem com duas subunidades NR2, de modo

que a glicina, um co-agonista, une-se subunidades NR1 e o glutamato as subunidades NR2 (SCHORGE et al., 2003).

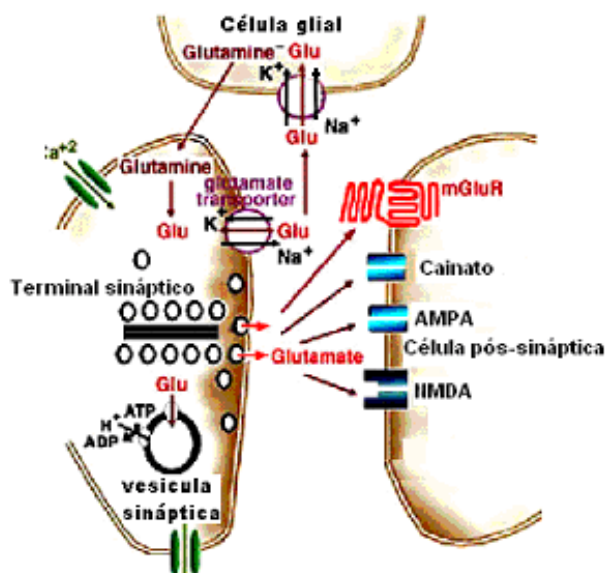


Figura 1. Figura esquemática da transmissão glutamatérgica. O glutamato, estocado em vesículas sinápticas localizadas no terminal sináptico, é liberado na fenda sináptica pela chegada de potenciais de ação. Uma vez liberado, o glutamato pode atuar sobre seus receptores localizados nas células pós-sinápticas ou ser recaptado por neurônios ou células gliais através da ação de transportadores glutamatérgicos.

Durante a transmissão sináptica, a ativação dos receptores NMDA requer a ligação simultânea de glicina e glutamato em combinação com despolarização do potencial de membrana (WAXMAN et al., 2005). No potencial de repouso, o canal do receptor é bloqueado pelo íon magnésio, o qual é expulso do canal após uma despolarização inicial. Com a abertura do canal do receptor NMDA, ocorre um influxo de íons sódio, potássio e

principalmente de íons cálcio (WAXMAN et al., 2005). A ativação dos receptores NMDA produz uma corrente de ascensão e decaimento lentos que superam em duração aquelas geradas por ativação dos receptores AMPA e cainato e deste modo acarreta em um potencial excitatório pós-sináptico mais prolongado (GIBB, 2004). A ativação dos receptores NMDA, deste modo, está associada a processos fisiológicos como o desenvolvimento, formação e plasticidade das sinapses, vinculados a fenômenos como a aprendizagem e a memória (CULL-CANDY, et al., 2001).

A ação sináptica do glutamato é finalizada por sua recaptação a partir da fenda sináptica por proteínas de membrana conhecidas como transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATS). Os EAATS são compostos de cinco membros: EAAT1 (GLT-1), EAAT2 (GLAST), expressos em células gliais, EAAT3 e EAAT4, expressos preferencialmente em neurônios e EAAT5 expresso na retina (PORCHE et al, 2003; NAKAGAWA & SATOH, 2004). A recaptação de glutamato está acoplada ao transporte de íons inorgânicos como o sódio, potássio e hidrogênio e utiliza a energia livre armazenada no gradiente eletroquímico desses íons para concentrar o glutamato no interior das células. A estequiometria do transporte sugere que a cada ciclo três íons sódio e um próton são co-transportados com o glutamato para o meio intracelular associado ao antiporte de um íon potássio para fora da célula (GREWER & RAUEN, 2005). Além disso, verificou-se que o transporte de glutamato está associado à ativação de um canal de cloreto, o transporte do qual não é termodinamicamente acoplado a recaptação de glutamato. Assim, o transporte de cloreto não é necessário para a translocação do substrato e parece ser um balanço contra o efeito despolarizante gerado pela entrada de sódio e a saída de potássio (KANAI & HEDIGER, 2004; SHIGERI et al, 2004).

1.2. Excitotoxicidade e Morte Celular

Newhouse e Lucas (1957) foram os primeiros a sugerir um papel neurotóxico para o glutamato ao demonstrarem que injeções de glutamato eram capazes de destruir as camadas internas da retina de camundongos. Esses resultados foram replicados por John W. Olney, em 1969, que estendeu os resultados de retinotoxicidade a compostos relacionados como o cainato e sugeriu o termo excitotoxicidade para indicar toxicidade por aminoácidos excitatórios. Assim, excitotoxicidade se refere ao processo no qual as células nervosas respondem inapropriadamente a concentrações elevadas de glutamato na fenda sináptica e que culminam com a morte celular (LYNCH et al., 2002). A excitotoxicidade pode resultar em dois tipos distintos de morte celular: a necrose e a apoptose (ANKRACRONA et al, 1995, BONFOCO et al, 1995). A necrose é o processo no qual ocorre tumefação da mitocôndria e do retículo endoplasmático, ruptura celular e geração de resposta inflamatória. A apoptose é caracterizada por condensação citoplasmática e nuclear, clivagem do ácido desoxirribonucleico (DNA) intra-nuclear e subsequente fagocitose (HICKEY & CHESSELET, 2003).

Durante a apoptose, ocorre a desorganização do citoesqueleto e o encolhimento celular com perda do contato com a matriz extracelular ou com as células adjacentes (PETTMANN & HENDERSON, 1998). As moléculas de DNA são fragmentadas por endonucleases e a cromatina condensa-se (LEBLANC, 2003). A clivagem do DNA acarreta a fragmentação do núcleo que, então, se dissolve no citoplasma. Esses fragmentos, conhecidos como corpos ou vesículas apoptóticas, estão envoltos por membrana. A superfície celular altera-se e adquire propriedades que provocam a fagocitose imediata por

macrófagos ou células vizinhas, antes de haver liberação do conteúdo celular (LEBLANC, 2003).

Classicamente, se divide duas vias apoptóticas: a via intrínseca, iniciada por um desequilíbrio na homeostase intracelular e a via extrínseca desencadeada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana plasmática (Figura 2). Ambas envolvem a ativação de enzimas proteolíticas denominadas caspases (cisteína-aspartato proteases) por conterem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivarem após resíduos de aspartato (ASHE & BERRY, 2003).

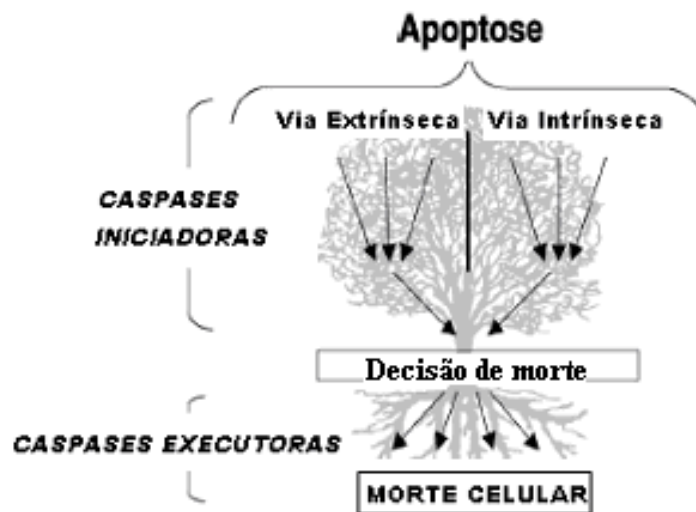


Figura 2. Representação esquemática da apoptose e suas vias clássicas. De acordo com o insulto de origem, duas vias apoptóticas podem ser identificadas: a via extrínseca e a via intrínseca. Estas envolvem a ativação de caspases iniciadoras distintas, mas culminam com a ativação da caspase 3 e conseqüentemente a morte celular.

As caspases são sintetizadas como zimogênios, pró-caspases, que são ativadas por processamento proteolítico em resíduos de aspartato específicos (ASHE & BERRY, 2003). De modo geral, as caspases são formadas por heterotetrâmeros, que após a proteólise formam dois fragmentos grandes e pequenos, formando assim dois heterodímeros (COHEN, 1997; GRÜTTER, 2000). Dois heterodímeros, então, se associam para originar a forma ativa da enzima (STENNICKE & SALVESEN, 1998). As caspases ativam ou inibem, por clivagem proteolítica, inúmeros alvos intracelulares como proteínas do citoesqueleto, da lamina nuclear, e proteínas envolvidas com o DNA e com a transdução de sinais (ASHE & BERRY, 2003).

A via intrínseca envolve o recrutamento de membros da família de proteínas Bcl-2 com atividade pró-apoptótica, como Bax, que sofre uma alteração conformacional e oligomeriza-se, com posterior translocação para a mitocôndria, onde induz a formação do poro de permeabilidade transitória na membrana mitocondrial e a liberação de fatores apoptogênicos que ativam as caspases efetoras (ORRENIUS et al, 2003). As caspases efetoras possuem como alvos intracelulares proteínas essenciais para a manutenção da morfologia celular, morte celular, clivagem do DNA, regulação do ciclo celular e transdução de sinais intracelulares (PETTMANN & HENDERSON, 1998).

A via extrínseca está relacionada aos receptores de membrana chamados de receptores de morte celular. Esses receptores fazem parte da família dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNF) e o processo de acoplamento entre molécula sinalizadora-receptor de morte celular acarreta a ativação das caspases 2, 8 e 10 (ASHE & BERRY, 2003). Após a ativação dessas caspases iniciadoras, as caspases efetoras 3, 6 e 7 são ativadas por proteólise (PETTMANN & HENDERSON, 1998). Assim, a via extrínseca é iniciada por um insulto extracelular que acarreta a ativação da caspase-8 pelos receptores

de morte. A caspase-8, por sua vez, leva a ativação da caspase-3, uma caspase efetora, que resulta na fragmentação do DNA, condensação da cromatina e morte celular (LEBLANC, 2003).

Durante o processo de excitotoxicidade, concentrações elevadas de glutamato na fenda sináptica causam a ativação demasiada dos receptores glutamatérgicos na célula pós-sináptica com conseqüente entrada de íons sódio e cálcio, o último, principalmente através dos receptores NMDA (WARING, 2005). O influxo excessivo de cálcio sobrecarrega os mecanismos reguladores como o seqüestro de íons cálcio pelas mitocôndrias e pelo retículo endoplasmático que mantêm a sua concentração intracelular baixa (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003). Deste modo, ocorre um desequilíbrio na homeostase desse íon que resulta na ativação inapropriada de diversos processos dependentes de cálcio (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003).

O acúmulo de cálcio intracelular pode resultar na ativação de proteases, lipases, fosfatases e endonucleases que medeiam a morte celular (HYND et al., 2004). Além disso, a entrada de cálcio via receptores NMDA pode causar a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Níveis aumentados de NO, gerados a partir da estimulação excessiva dos receptores NMDA, podem reagir com ânions superóxido com a resultante formação do peróxido de nitrito (MARK et al, 2001). Este, por sua vez, é extremamente tóxico às células, e em excesso pode provocar dano no DNA e disfunção mitocondrial e concomitantemente, morte celular (MARK et al, 2001). Além disso, o seqüestro de cálcio livre intracelular pelas mitocôndrias após abertura excessiva dos receptores NMDA leva a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e inibição da cadeia de transporte de elétrons que acarretam no bloqueio da síntese de ATP

com conseqüente comprometimento dos processos dependentes da hidrólise de ATP (NICHOLLS & BUDD, 1998).

Acredita-se que morte neural excitotóxica esteja envolvida em afecções neurológicas agudas e crônicas. Essas situações patológicas incluem as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, isquemia cerebral, glaucoma, demência associada ao HIV e epilepsia (MARK et al, 2001; HYND et al, 2004; WAXMAN & LYNCH, 2005). Todas essas patologias são causadas por mecanismos distintos, mas poderiam compartilhar uma via final comum ao dano neuronal devido à estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos, especialmente do subtipo NMDA (LIPTON, 2004). Dessa forma, antagonistas de receptores NMDA poderiam, potencialmente, proporcionar um benefício terapêutico nessas desordens neurológicas. Contudo, apesar de antagonistas de receptores NMDA prevenirem o dano neuronal excitotóxico em modelos *in vitro* e *in vivo*, essas drogas possuem uma aplicação clínica limitada devido aos efeitos colaterais (LIPTON, 2004). Estes incluem náuseas, psicose, vômito, déficits mnemônicos e morte neuronal ocasionada pelo bloqueio completo dos receptores NMDA, visto o papel importante que estes possuem nos processos neuronais normais (STONE & ADDAE., 2002; WAXMAN & LYNCH, 2005). Visto assim, a identificação de outros mecanismos de neuroproteção possibilita novas oportunidades para a geração de estratégias terapêuticas com potencial utilização clínica no tratamento de pacientes acometidos com desordens neuronais agudas e crônicas (SCHALLER & GRAF, 2002; DIRNAGL et al, 2003).

1.3. Pré-condicionamento

O termo pré-condicionamento foi introduzido por Janoff (1964) no intuito de descrever a resposta de tolerância do organismo ao estresse letal induzida pela exposição prévia a baixas doses de agentes ou estímulos tóxicos. Praticamente, qualquer estímulo capaz de gerar dano ao organismo ou aos tecidos pode, quando aplicado abaixo do limiar de injúria, ativar mecanismos endógenos de proteção, assim amenizando o impacto de estímulos deletérios posteriores (DIRNAGL et al, 2003). Assim, o princípio geral do pré-condicionamento é a obtenção de um estado de proteção celular, tecidual ou do organismo como um todo através da exposição a insultos subletais que conferem, deste modo, certa tolerância a um insulto letal posterior (DIRNAGL et al, 2003; MERGENTHALER et al, 2004).

Em um experimento realizado com cães em 1984, Judith Swain e colaboradores observaram que após a indução de um episódio curto de isquemia cardíaca por oclusão da artéria coronária esquerda o conteúdo desses nucleotídeos após os episódios seguintes diminuía em uma taxa mais lenta. Com um mesmo modelo experimental semelhante e com base nesses resultados, Charles Murry e Keith Reimer (1986) realizaram oclusões breves (5 min) seguidas de oclusão prolongada da artéria circunflexa de cães (40 min) e observaram que a área de infarto nesses animais pré-condicionados era consideravelmente menor, ou seja, o miocárdio pré-condicionado tornava-se tolerante a um insulto posterior mais grave. Os autores atribuíram essa proteção à diminuição da depleção de ATP ou ao possível menor acúmulo de catabólitos tóxicos no miocárdio dos cães (REIMER et al, 1986).

A primeira descrição de pré-condicionamento no SNC foi realizada por Kitagawa e cols (1991) que relataram a neuroproteção promovida por um breve episódio isquêmico contra uma isquemia letal posterior em diversas áreas do cérebro, como as regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Como postulado pelo seu princípio, estudos posteriores demonstraram

que esse estado de tolerância ao dano cerebral pode ser obtido por diversos meios sejam estes químicos, elétricos ou anóxicos, de modo que tem se demonstrado a participação dos receptores NMDA na geração dessa neuroproteção endógena em diferentes modelos de pré-condicionamento por meio da administração de antagonistas como o MK-801 e a ketamina (BOND et al, 1999; REJDAK et al, 2001; SCHALLER & GRAF, 2002; SAMOILOV et al, 2003).

Acredita-se que a os mecanismos responsáveis pela neuroproteção induzida pelo pré-condicionamento envolva a atenuação de diferentes processos que acarretam em dano celular como a excitotoxicidade, o desequilíbrio iônico, o estresse oxidativo e nitrosativo, a disfunção metabólica, a inflamação e processos relacionados a morte celular necrótica e apoptótica (GIDDAY, 2006). Sugere-se que a proteção também seria obtida pelo ativação de mecanismos envolvidos com a sobrevivência celular e pelo aumento dos processos de reparo endógenos, os quais diminuiriam a extensão da lesão neural e, concomitantemente, facilitariam a recuperação da função cerebral (GIDDAY, 2006).

Nesse contexto, a administração de dose subconvulsivante de NMDA via intraperitoneal tem sido utilizada como modelo de pré-condicionamento químico frente a diversos insultos letais posteriores (BOECK et al, 2004). Tais modelos têm demonstrado que este tratamento protege neurônios hipocâmpais de insulto isquêmico (MIAO et al, 2005) e protege camundongos da convulsão induzida por ácido quinolínico (AQ) por um período de tempo de 24 a 48 após o pré-condicionamento com NMDA, no entanto, sem alterar a latência e a duração das convulsões (BOECK et al, 2004). Além disso, nesse estudo Boeck e cols (2004) demonstraram que o pré-condicionamento com NMDA protege neurônios hipocâmpais da morte celular induzida pelo AQ tanto em animais que não convulsionam quanto naqueles que convulsionam.

Entretanto, o tipo de morte celular ocasionado pelas convulsões induzidas pelo AQ e a ativação ou não de proteínas pró- ou anti-apoptóticas pelo pré-condicionamento induzido por NMDA permanecem desconhecidos. A análise da fragmentação de DNA, realizada 24 horas após as convulsões induzidas pelo AQ, no hipocampo e córtex de camundongos pré-condicionados com NMDA, revelou ausência de alteração em relação ao grupo controle (BOECK et al, 2005a). Além disso, a ativação de caspase-3 não foi detectada na região CA1 do hipocampo após 24 horas da injeção de AQ nesses animais (BOECK et al, 2005a).

1.4. Glutathione

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo (L- γ -glutamyl-L-cystenylglycine), contendo cisteína e é o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos (DIRNAGL et al, 2003). A GSH participa de diversos processos celulares, tais como: a síntese de DNA, proteínas, leucotrienos e a modulação da função protéica (SIMS et al, 2004; NJALSSON, 2005). No entanto, a GSH exerce um importante papel como antioxidante nas células participando, assim, da proteção contra o estresse oxidativo (Dirnagl et al, 2003). O estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio no estado de equilíbrio no sistema de pró-oxidantes e antioxidantes das células intactas, ou seja, uma condição na qual exista um desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (EMERIT et al, 2004).

A GSH pode reagir não enzimaticamente com diversos compostos oxidativos ou servir de substrato para a ação da glutathione peroxidase (GPx) na detoxificação de peróxidos orgânicos e de hidrogênio (Figura 3). A GSH também pode participar de outras

reações anti-oxidantes, tais como na detoxificação de compostos eletrofilicos, como o 4-hidroxinonenal, pela ação da glutathione S-transferase (MAHER, 2005). A eliminação de peróxidos mediada pela GPx conduz a formação da glutathione dissulfeto (GSSG, glutathione oxidada), a qual pode ser reduzida novamente à GSH por meio da enzima glutathione redutase (GR), em uma reação dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (WANG & BALLTORI, 1998) (Figura 3). A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) reduz a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP^+) à NADPH e desse forma participa na proteção frente ao estresse oxidativo por manter a GSH no seu estado reduzido (MAHER, 2005).

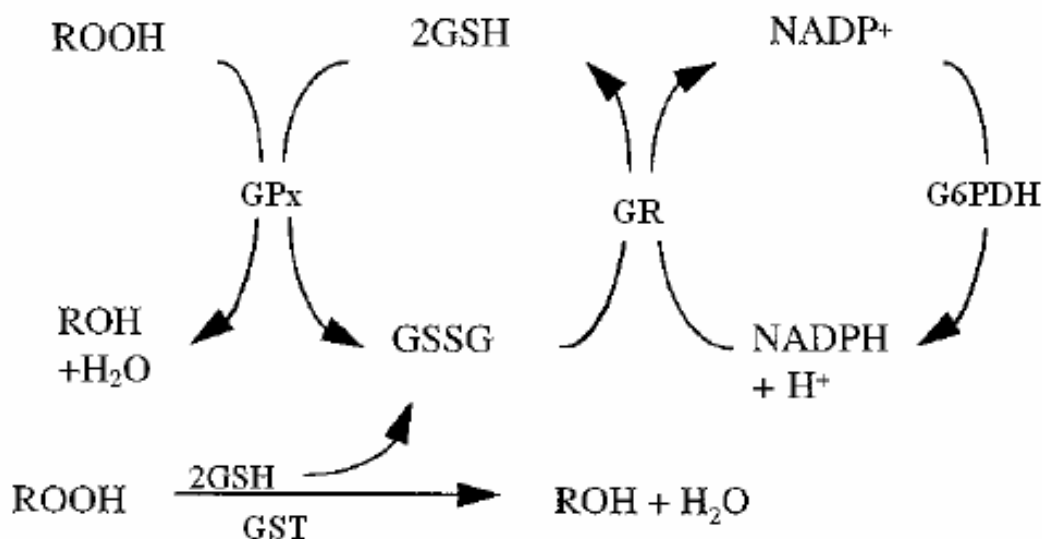


Figura 3. Esquema ilustrativo das funções antioxidantes da glutathiona. Um hidroperóxido (ROOH) é reduzido pela glutathiona peroxidase (GPx) através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona dissulfeto (GSSG). A GSSG é reduzida novamente a GSH através da ação da glutathiona redutase (GR) com oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) à nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺), que é reduzido novamente pela G6PDH. A GSH também pode ser utilizada pela glutathiona S-transferase (GST) na detoxificação de compostos eletrofilicos.

Normalmente, o cérebro mantém uma proporção entre GSH/GSSG elevada como uma defesa antioxidante (WANG & BALTTORI, 1998). Foi demonstrado que em modelos nos quais ocorre a depleção das reservas intracelulares de GSH, observa-se a morte neuronal por apoptose, além disso, demonstrou-se que o uso de drogas que causam diminuição da GSH intracelular tem implicado em maior dano neuronal em resposta a isquemia (SAVITZ & ROSENBAUM, 1998). Assim, sabe-se que o estresse oxidativo severo diminui os níveis de GSH total (GSH-t) (TAN et al, 2001), enquanto que estresse celular moderado pode levar a um aumento nos níveis de GSH-t, o que provavelmente está envolvido na geração da tolerância celular a insultos posteriores letais (DICKINSON & FORMAN, 2002; SEO et al, 2004).

1.5. Ácido Quinolínico

O ácido quinolínico (AQ), um metabólito do triptofano proveniente da via das quinureninas, foi inicialmente estabelecido como um intermediário na síntese do ácido nicotínico e da nicotinamida adenina dinucleotídeo (STONE, 2001). A sua importância no

SNC só foi reconhecida quando o bioquímico russo Izyaslav Lapin (1978) realizou um experimento no qual seis quinureninas: DL-quinurenina, ácido quinolínico, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido xanturênico, ácido picolínico, e o ácido nicotínico foram injetadas individualmente no ventrículo lateral de camundongos. Lapin observou que todas essas substâncias produziram excitação motora e/ou convulsões clônicas, e que dentre estes, o metabólito com ação mais potente era o ácido quinolínico. Logo depois, Trevor Stone e Martin Perkins (1981) analisaram a ação excitatória do AQ e de seus análogos injetados em diferentes regiões do SNC e foram os primeiros a levantar suspeita sobre a existência de subtipos de receptores NMDA.

Atualmente, sabe-se que o AQ causa convulsões através da ação sobre os receptores NMDA, particularmente, aqueles que contêm subunidades NR2B (MORONI, 1999; SCHWARCZ & PELLICCIARI, 2002). A toxicidade do AQ tem sido implicada em diversas condições patológicas do SNC, como as doenças de Huntington e Parkinson (STONE, 2001), na demência associada a infecção com HIV e na etiologia da epilepsia em humanos (HEYES et al, 1989; HEYES et al, 1990). Assim, a administração cérebro-ventricular de AQ tem sido utilizada em modelos animais de convulsões, modelos nos quais observa-se convulsões tônico-clônicas e morte neuronal nas diversas regiões hipocampais (SCHMIDT et al, 2000; GANZELLA et al, 2006).

Dessa forma, a toxicidade promovida pelo AQ envolve a ativação dos receptores NMDA, com desequilíbrio da homeostase do íon cálcio intracelular e disfunção mitocondrial com exaustão do ATP intracelular (STONE & DARLINGTON, 2002; NAREDO et al, 2005). Além disso, a toxicidade promovida pelo AQ envolve mecanismos de estresse oxidativo (NAREDO et al., 2005). Alguns desses mecanismos incluem a formação de complexos entre o AQ e o íon ferro (Fe^{+2}) que medeiam a geração de EROS,

alteração do perfil de alguns antioxidantes endógenos, aumento da produção de espécies reativas de nitrogênio, com conseqüente peroxidação lipídica e carbonilação protéica (SANTAMARÍA et al, 2003; METERE et al, 2006;).

Além da atuação direta sobre os receptores NMDA, estudos mostraram que o AQ pode sobrecarregar o sistema glutamatérgico pela modulação do transporte de glutamato. Demonstrou-se que o AQ é um inibidor da captação de glutamato tanto em preparações de vesículas sinápticas (TAVARES et al, 2000) quanto em astrócitos em cultura (TAVARES et al, 2002). O tratamento *in vivo* com AQ não afeta a captação de glutamato por sinaptossomas obtidos do cérebro de ratos (TAVARES et al, 2005). Entretanto, demonstrou-se uma diminuição na captação de glutamato em fatias de hipocampo após a administração *in vivo* (i.c.v.) de AQ em ratos (Oliveira et al, 2004). Essas discrepâncias podem ser devidas aos diferentes tipos de transportadores de glutamato. O AQ também exerce ação sobre a liberação basal de glutamato em sinaptossomas tanto *in vitro* (TAVARES et al, 2002) como após o tratamento *in vivo*, sem afetar a liberação induzida por altas concentrações de potássio (TAVARES et al, 2005). Estes dados sugerem que o AQ promove excitotoxicidade ao atuar nos NMDAR, assim como, por elevar a concentração extracelular de glutamato.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na proteção e morte celular no pré-condicionamento com NMDA e nas convulsões induzidas pelo ácido quinolínico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Identificar o tipo de morte celular envolvida após o tratamento com ácido quinolínico, avaliando a fragmentação de DNA em intervalos de 8, 24, 48, 72, 96 horas após a administração de AQ.

2. Avaliar a fragmentação de DNA 48 horas após o pré-condicionamento com NMDA e após as convulsões induzidas com AQ.
- 3 - Avaliar a expressão da proteína Caspase-3 em animais pré-condicionados com NMDA e 24 horas após as convulsões induzidas com AQ.
- 4 - Avaliar a participação de defesas antioxidantes não-protéicas (glutathione) no pré-condicionamento com NMDA e 24 horas após convulsões induzidas com AQ.
- 5 - Avaliar a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo da glutathione, GPx, GST, GR e G6PDH, no pré-condicionamento com NMDA e 24 horas após convulsões induzidas com AQ.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido quinolínico (AQ), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP⁺), glicose 6-fosfato (G6P), tert-butilhidroperóxido (tBOOH), cloreto de magnésio, glutathione oxidada (GSSG) e reduzida (GSH), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), glutathione redutase, albumina bovina sérica, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.). Proteinase K foi obtida da Boehringer Mannheim. Anticorpo anti-caspase-3 foi obtido da ONCOGENE. β -mercaptoetanol, ácido bórico, anticorpos secundários anti-mouse conjugados à peroxidase, brometo de etídio, glicina, Kit de extração de DNA (GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit), Kit ECL, membrana de nitrocelulose, padrão de pares de bases, persulfato de amônia, duodecil sulfato de sódio (SDS) e Tris (hidroxi-metil-amino-metano) foram obtidos da GE HealthCare. Padrão de

peso molecular foi obtido da BIO-RAD. Filmes fotográficos, soluções reveladora e fixadora foram obtidos da KODAK. Tiopental sódico foi obtido da Cristalia (Itapira, SP, Brazil).

3.2. Equipamentos

Agitador magnético, Q-221-2 – Quimis, Aparelho estereotático – David Kopf, Banho-maria, dbm 120 – Benfer, Centrífuga, 5415 D – Eppendorf, Cuba de eletroforese - Amersham Pharmacia Biotech, Cuba de eletrotransferência - Amersham Pharmacia Biotech, Espectrofotômetro – Varian Cary 50.

3.3. Animais:

Os camundongos albinos Swiss machos (30-40 g) foram mantidos em temperatura de 22 ± 1 °C em um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro, em caixas plásticas (5 animais por caixa) com água e ração disponíveis. Os nossos protocolos para experimentos com animais foram projetados de maneira que o animal tenha o mínimo de sofrimento possível e com limite de animais sacrificados (conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC).

3.4. Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com tiopental de sódio administrado por via intraperitoneal (i.p.) (10 mL/Kg do animal) e uma cânula guia foi implantada para infusão intra-

cerebroventricular (i.c.v.) (SCHMIDT et al, 2000). Em um estereotáxico, a pele do crânio foi removida e uma cânula guia de 30 G/7 mm foi implantada a 1 mm posterior ao bregma, 1 mm à direita da linha mediana, 1 mm abaixo do ventrículo lateral e fixada com cimento acrílico.

3.5. Tratamento com NMDA

Após a administração de NMDA (75 mg/Kg de animal) ou salina (NaCl 0,9%) i.p. os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico (20 x 20 x 20 cm) e, então, observados por 30 min para a ocorrência de mudanças comportamentais. Os animais retornaram para a sua respectiva caixa e permaneceram por 24 ou 48 horas.

3.6. Convulsões com Ácido Quinolínico

O ácido quinolínico (4 µL, 9,2 mM, pH 7) ou salina (NaCl 0,9%) foram administrados i.c.v. através de uma agulha de 30 G/8 mm, introduzida pela cânula guia. Os animais foram colocados em caixas de acrílico e observados por 10 min para a ocorrência de mudanças comportamentais como 'wild running' (corrida involuntária), episódios convulsivos tônico ou clônico e convulsão tônico-clônica, que devem ocorrer por pelo menos 5 segundos (HALLAK et al, 1993). Os animais pré-tratados com NMDA que não apresentaram as convulsões foram considerados protegidos. Os animais retornaram para a sua respectiva caixa e permaneceram por 24 horas para os experimentos de imunodeteção da caspase-3 e de avaliação do metabolismo da GSH.

Nos experimentos de fragmentação de DNA, os animais foram injetados com AQ (4µl, 9.2mM, pH 7, i.c.v.), então, colocados em caixas de acrílico e observados para a ocorrência de episódios convulsivos tônico ou clônico e convulsão tônico-clônica. (HALLAK et al, 1993). Os animais retornaram para sua respectiva caixa e permaneceram por 8, 24, 48, 72 e 96 horas.

3.7. Separação de Proteínas por Eletroforese (SDS-PAGE)

3.7.1. Separação de Proteínas por Eletroforese

Os córtices cerebrais e hipocampos foram solubilizados em 100 µl de tampão de amostra (SDS 4 %, 50 mM de Tris-HCl e 100 mM de EDTA , pH 6,8), aquecidas por cinco minutos para permitir a homogeneização do tecido e 10 µl de amostra foram retirados para dosagem de proteína pelo método de Peterson (1977). Em seguida foi adicionada a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, 25 mM de Tris-HCl e azul de bromofenol; pH 6,8), numa proporção solução de diluição/solução de amostra de 25:100 (v/v), e β-mercaptoetanol 8%. As proteínas totais (60 µg/poço) foram separadas em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) usando gel de separação com acrilamida 12 % e gel de

entrada a acrilamida 4 %. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 140 mV (para 2 géis), por 1-2 horas em temperatura ambiente. utilizando-se o tampão superior (190mM de glicina, 25mM de Tris e SDS 0,1%) e o inferior (50 mM de Tris-HCl; pH 8,3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

3.7.2. Eletrotransferência e Imunodeteccção de proteínas (Western blot)

Após a eletroforese, o gel foi lavado com tampão superior de eletroforese por 30 min. Em seguida, o gel foi equilibrado em tampão de transferência com metanol 10% (50 mM de Ácido Bórico e 4 mM de EDTA; pH 8,9) durante 30 minutos. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose (0,4 µm) no sentido do pólo negativo para o positivo, utilizando um “sanduíche” compreendido de espuma de suporte, papel filtro, gel, nitrocelulose, novamente papel filtro e espuma de suporte. A transferência foi realizada a 4°C usando corrente de 400 mA por 1,15 h em uma cuba contendo tampão de transferência. Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau [0,5% de Ponceau (w/v) em 1% de ácido acético (v/v)] para controle da transferência e em seguida lavadas com TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5).

Após a lavagem com TBS, as membranas foram bloqueadas (1 hora) com leite desnatado 5 % em TBS e a seguir lavadas por 3 vezes de 5 min com TBS-T (Tween-20 0,05 %, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As membranas foram incubadas com anticorpos primários (1:250) contra a proteína caspase-3 por 12-14h horas. Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T e o anticorpo secundário (ligado à peroxidase) na diluição de 1:8000 incubado por 1 hora. Após lavagens com TBS-T a detecção foi revelada por emissão de quimioluminescência (Kit ECL),

seguindo as recomendações do fabricante. As medidas de imunocnteúdo das proteínas foram realizadas através de densitometria, utilizando o programa Scion Image – Release Beta 4.0.2., Scion Corporation.

3.8. Análise da Fragmentação do DNA

Os córtices e hipocampos foram lisados e homogeneizadas através de incubação em um tampão de lise (GenomicPrepTM-Cells and Tissue DNA Isolation Kit, GE Healthcare.) e as proteínas e o RNA liberados das células foram hidrolizados pela adição de proteinase K (100 µg/ml) e RNase (20 µg/ml), respectivamente. O homogeneizado foi centrifugado a 16.000 g por 15 min a 4 °C. Os ácidos nucleicos foram então sedimentados utilizando-se isopropanol a 4 °C durante um período de 12 horas e posteriormente centrifugados a 16.000 g por 30 min. Aos precipitados formados foi adicionado etanol 70 % com posterior centrifugação a 16.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e então foi adicionada uma solução de reidratação (kit). O DNA obtido foi então submetido a uma eletroforese em um gel de agarose a 2 % com 100 µg/ml de brometo de etídio e posteriormente visualizado utilizando-se um transiluminador como fonte de luz ultravioleta (YANG & PAUL, 1997).

3.9. Avaliação dos níveis de Glutathiona total (GSH-t)

Os córtices e hipocampos foram homogeneizados em 10 volumes de ácido perclórico 0,5 M e centrifugados a 15.000 g por 2 min. Para determinar os níveis de glutathiona total (glutathiona reduzida + oxidada), foi utilizado o método descrito por Tietze (1969) e

modificado por Akerboom & Sies (1981). O meio de reação utilizado era composto por 0,1 M fosfato de potássio, 1 mM EDTA, pH 7,0, ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 1,67 mg/ml, NADPH 4 mg/ml em 0,5% de KHCO_3 ou NaHCO_3 e GR 0,1 U/ml. A 810-900 μL do meio de reação, adiciona-se 100-10 μl de amostra. Uma curva padrão de GSSG foi construída para comparação com a leitura de equivalentes de GSH-t das amostras, a qual foi realizada a 25°C por 3 min, a 412 nm e é expressa em $\Delta\text{ABS}^{\text{TNB}}/\text{min}$. A inibição da GR é um fator crítico do método. Para corrigir esta inibição uma quantidade conhecida de GSSG (0,5 μM em 50 μl) foi adicionada à amostra, e serviu como um controle interno (DAFRÉ, 1996).

3.10. Ensaios Enzimáticos

Os córtices cerebrais e hipocampos foram homogeneizados em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4. As amostras foram então centrifugadas a 20.000 g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante resultante foi usado para os ensaios enzimáticos. As atividades enzimáticas foram determinadas no sobrenadante em um espectrofotômetro Varian Cary 50.

3.10.1. Avaliação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a redução do H_2O_2 , bem como de peróxidos orgânicos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-substrato para esta reação para produzir glutathione oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutathione redutase com o consumo de NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que pode ser acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm (Wendel, 1981; Flohé & Günzler, 1984). Para este ensaio, o meio de reação continha 0,1 M de tampão fosfato pH 7,0, 1 mM de EDTA, 1 mM de GSH e 0,1 mM de NADPH. Adicionou-se amostra neste meio para mensurar o consumo inespecífico de NADPH

através de uma leitura por 2 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato t-BOOH (hidroperóxido de tert-butila) 1 mM, a leitura foi realizada por mais 2 min. Ao decréscimo de absorbância por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como nUnidade/min/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a $1 \mu\text{mol/ml/min}$.

3.10.2. Avaliação da Atividade Glutathione S-Transferase (GST)

Durante o ensaio, a GST catalisa a conjugação da GSH com o substrato sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) que produz um conjugado que é detectado em 340 nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig & Jakoby, 1981). Para este ensaio, o meio de reação continha 0,1M de tampão fosfato pH 7,0, 1 mM de EDTA e 1 mM de GSH. Foram feitas leituras independentes realizadas por 2 min para mensurar a velocidade da reação espontânea do CDBN com GSH, neste caso, sem a presença da amostra. Depois de acrescentar a amostra e o segundo substrato (CDNB 1 mM) ao meio de reação, realizou-se a leitura por 2 min a 340 nm a 30° C. Ao decaimento por minuto obtido com a amostra, descontou-se a velocidade da reação espontânea. O valor obtido pelo coeficiente de extinção molar do conjugado GSH/CDNB ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína.

3.10.3. Avaliação da atividade da Glutathione Redutase (GR)

A GR é uma enzima que catalisa a redução dependente de NADPH da glutathione oxidada (GSSG) em glutathione reduzida (GSH). O meio de reação utilizado para a

avaliação desta enzima foi composto por 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0, 1 mM de EDTA, 1 mM de GSSG e 0,225 mM de NADPH. Após adicionar a amostra, o consumo inespecífico de NADPH foi medido por 2 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato GSSG 1 mM, a leitura foi realizada por 2 min adicionais. Do decaimento por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a $1 \mu\text{mol/ml/min}$.

3.10.4. Avaliação da atividade da Glicose 6-fosfato Desidrogenase (G6PDH)

A G6PDH catalisa a redução de NADP^+ à NADPH através da oxidação da glicose 6-fosfato. A glicose 6-fosfato é oxidada pela G6PDH com o formação de NADPH, que pode ser acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm (GLOCK & MCLEANC, 1953). O meio de reação utilizado para a avaliação desta enzima foi composto por 50 mM de Tris pH 7,4, 3 mM de MgCl_2 , 0,13 mM de NADP^+ , 1,5 mM de glicose- 6-fosfato. Ao meio de reação com a amostra foi adicionado o substrato glicose 6-fosfato 1,5 mM e a absorbância relativa à formação do NADPH/min foi lida a 340 nm durante 2 minutos a 30°C . O valor foi expresso como mUnidade/mg de proteína.

3.11. Dosagem de proteína:

A concentração protéica foi determinada pelo método de Peterson (1977) para proteínas que foram submetidas à eletroforese ou pelo método de Bradford (1976) nos experimentos de dosagem da atividade enzimática. A albumina bovina sérica foi utilizada como padrão.

3.12. Análise estatística:

A análise estatística foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão e os experimentos foram realizados em triplicatas. Foram considerados significativos valores com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA

Boeck e cols (2004) demonstraram que a administração i.c.v. de AQ induz lesão celular no hipocampo de camundongos. No entanto, o tipo de morte celular desencadeada pela infusão de AQ *in vivo* não é bem conhecido. Sabe-se que a indução de fragmentação do DNA tem sido considerada como um parâmetro para a caracterização de morte celular por apoptose (ISHIMARU et al, 1999; SASTRY & RAO, 2000). Deste modo, este parâmetro de morte celular por apoptose foi utilizado para identificar o tipo de morte celular induzido pelo AQ *in vivo*.

Os camundongos foram tratados com AQ para a indução de convulsões e após 8, 24, 48, 72, ou 96 horas foram mortos por decapitação e os córtices cerebrais e hipocampos removidos para a análise da fragmentação do DNA. O padrão de migração eletroforética em gel de agarose de amostras de DNA extraídas do córtex cerebral e hipocampo pode ser observado nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Nestas figuras pode se observar que o tratamento com AQ não promoveu fragmentação do DNA em nenhum dos tempos observados tanto no córtex cerebral (Figura 4) quanto no hipocampo (Figura 5) quando comparados com o grupo controle tratado com salina (NaCl 0.9%, i.c.v.)

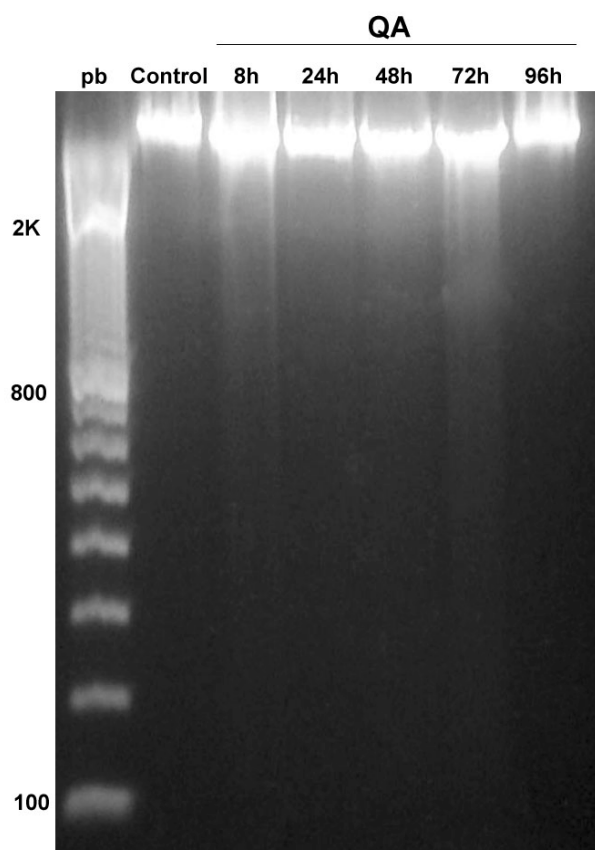


Figura.4. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA do córtex de camundongos após tratamento com ácido quinolínico i.c.v. Os animais foram mortos

por decapitação 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v.). As colunas correspondem: pb: marcador de pares de bases de DNA 100 pb; Controle: salina. A análise da fragmentação do DNA ocorreu por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito em Materiais e Métodos. Figura representativa de três experimentos do gel de agarose para amostras do córtex.

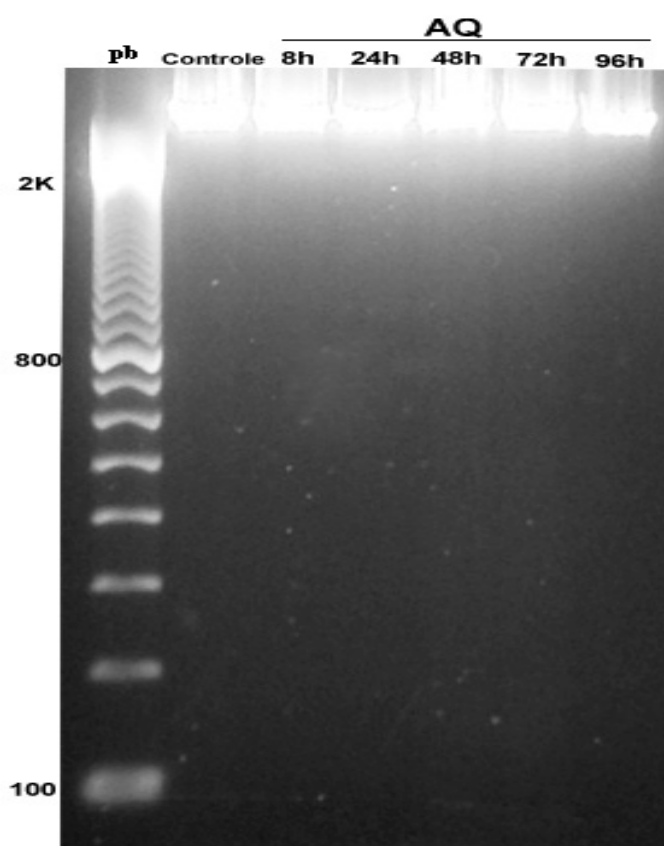


Figura. 5. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA do hipocampo de camundongos após tratamento com ácido quinolínico i.c.v. Os animais foram mortos por decapitação 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v.). As colunas correspondem: pb: marcador de pares de bases de DNA 100 pb; Controle: salina. A

análise da fragmentação do DNA ocorreu por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito em Materiais e Métodos. Figura representativa de três experimentos do gel de agarose para amostras do hipocampo.

Demonstrou-se que o pré-condicionamento com NMDA é eficiente em proteger os animais das convulsões induzidas pelo AQ e do dano celular causado pelo mesmo durante um intervalo de tempo de 24 a 48 horas (BOECK et al, 2004). Contudo, os mecanismos desencadeados pelo pré-condicionamento não são bem caracterizados. A análise da fragmentação do DNA de amostras do córtex cerebral e hipocampo de camundongos 24 h após as convulsões induzidas pelo AQ em animais pré-condicionados com NMDA não revelou nenhum aumento na fragmentação do DNA (BOECK et al, 2005).

Com o intuito de verificar se o pré-condicionamento com NMDA altera a fragmentação de DNA por um período de tempo mais prolongado, este parâmetro de morte celular foi avaliado em amostras de DNA do córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e 48 horas após as convulsões induzidas pelo AQ. Quando comparados com o grupo controle, o pré-condicionamento com NMDA não promoveu nenhuma alteração na fragmentação do DNA no córtex cerebral (Figura 6) e no hipocampo (Figura 7) tanto nos animais protegidos das convulsões induzidas por AQ, como naqueles não protegidos.

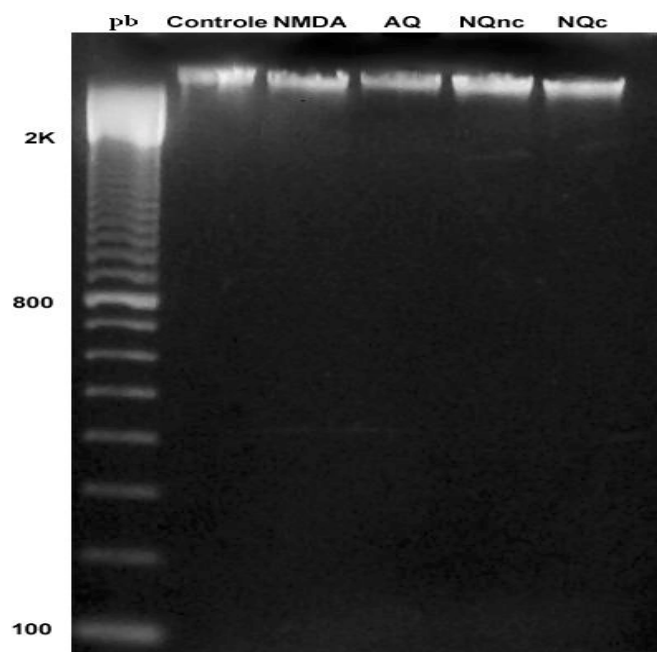


Figura. 6. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA do córtex cerebral de camundongos 48 horas após tratamento com NMDA e/ou ácido quinolínico. Os animais foram tratados com veículo (salina, grupo controle), ou NMDA (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v) e foram observados por 10 minutos para a ocorrência de convulsões. Os animais retornaram para suas respectivas caixas e foram mortos após 48 h da infusão de AQ e os córtices cerebrais foram removidos. NQnc indica os animais tratados NMDA + QA não convulsionados e NQc indica os animais tratados com NMDA + QA convulsionados pb: marcador de pares de bases de DNA 100 pb. A análise da fragmentação do DNA ocorreu por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito em Materiais e Métodos. Figura representativa de três experimentos.

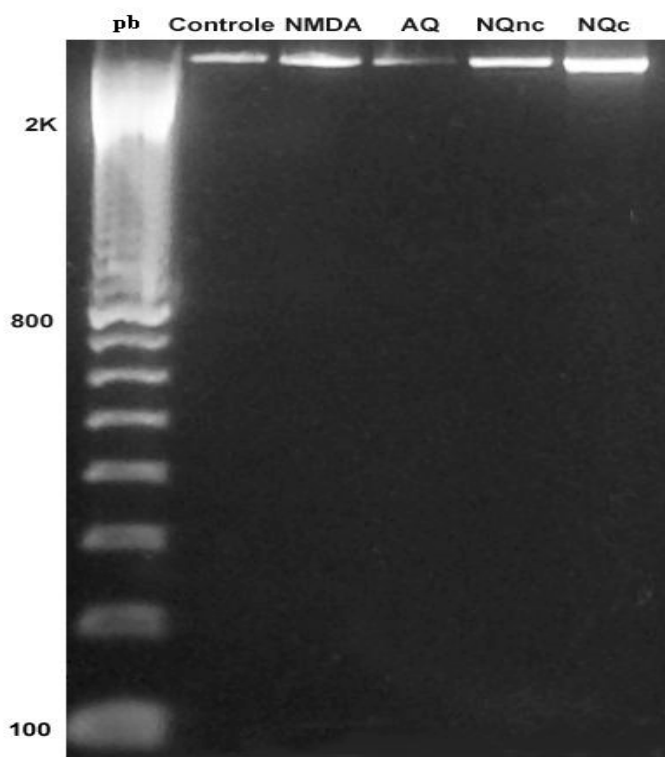


Figura. 7. Análise da fragmentação internucleossomal do DNA do hipocampo de camundongos 48 horas após tratamento com NMDA e/ou ácido quinolínico. Os animais foram tratados com veículo (salina, grupo controle), ou NMDA (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v) e foram observados por 10 minutos para a ocorrência de convulsões. Os animais retornaram para suas respectivas caixas e foram mortos após 48 h da infusão de AQ e os hipocampus foram removidos. NQnc indica os animais tratados NMDA + QA não convulsionados e NQc indica os animais tratados com NMDA + QA convulsionados pb: marcador de pares de bases de DNA 100 pb. A análise da fragmentação do DNA ocorreu por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito em Materiais e Métodos. Figura representativa de três experimentos.

4.2. IMUNODETECÇÃO DA CASPASE-3.

Diversos estudos demonstraram que as vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose convergem para a ativação da caspase-3, onde esta é ativada através de um processo de proteólise (COHEN, 1997; STENNICKE & SALVESEN, 1998; GRÜTTER, 2000). Visto que um dos mecanismos propostos para a geração da tolerância cerebral induzida pelo pré-condicionamento envolve a atenuação das vias de morte celular, foi realizada uma avaliação da participação da caspase-3 no pré-condicionamento com NMDA e nas convulsões induzidas pelo AQ.

A imunomarcção da caspase-3 foi avaliada no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e 24 horas após as convulsões induzidas pelo AQ. A caspase-3 total (32 kDa) e o fragmento de 17 kDa foram detectados tanto no córtex cerebral (Figura 8 A) como no hipocampo (Figura 9 A). No entanto, a quantificação da imunodeteção da caspase-3 (Figura 8 B e Figura 9 B) não revelou nenhuma alteração entre os tratamentos realizados independente da ocorrência ou não de convulsões em relação ao grupo controle.

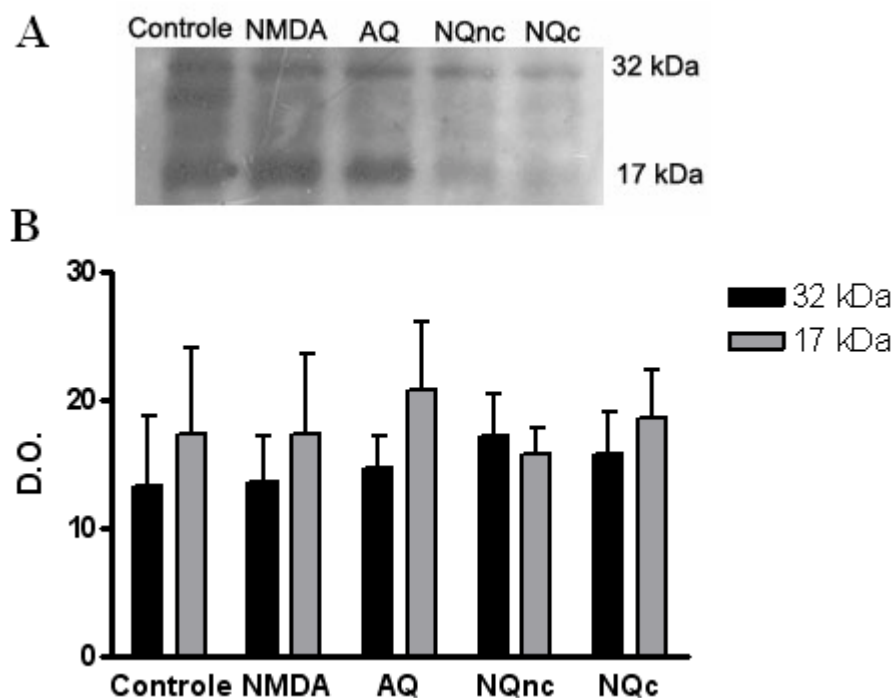


Figura 8. Imunodeteção da proteína Caspase-3 e de seu fragmento de 17 kDa no córtex cerebral de camundongos tratados com NMDA e/ou ácido quinolínico. Os animais foram tratados com veículo (salina, grupo controle) ou NMDA (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v.) e foram observados por 10 minutos para a ocorrência de convulsões. NQnc indica os animais tratados NMDA + QA não convulsionados e NQc indica os animais tratados com NMDA + QA convulsionados **A.** Fotografia representativa de “western blotting” do córtex cerebral de camundongos, n = 6. **B.** Quantificação da densidade ótica das bandas marcadas para a proteína Caspase-3 de amostras do córtex cerebral. Os valores representam média \pm erro padrão. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

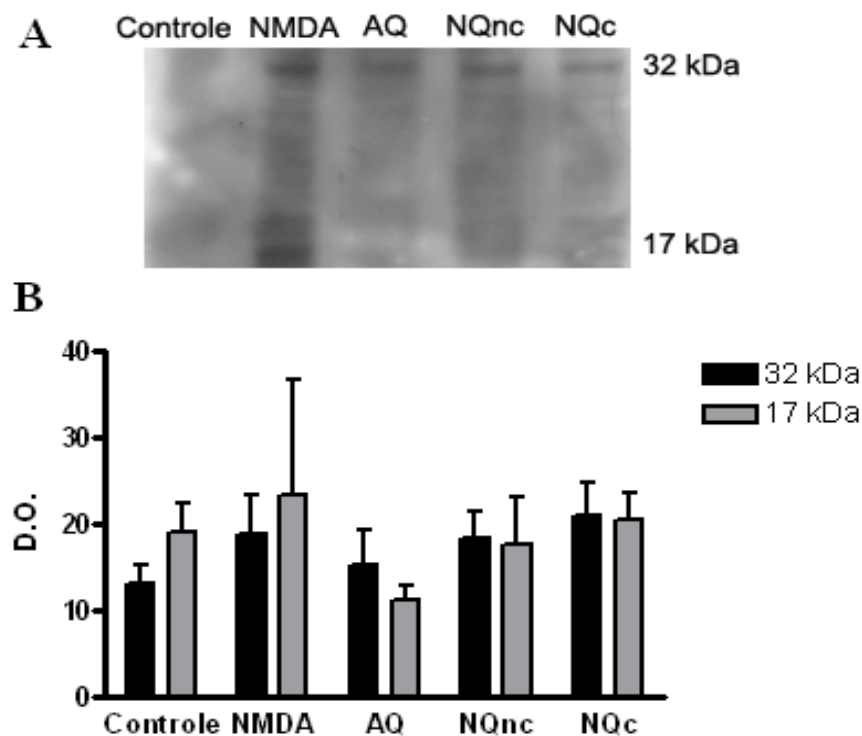


Figura 9. Imunodeteção da proteína Caspase-3 e de seu fragmento de 17 kDa no hipocampo de camundongos tratados com NMDA e/ou ácido quinolínico. Os animais foram tratados com veículo (salina, grupo controle) ou NMDA (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v.) e foram observados por 10 minutos para a ocorrência de convulsões. NQnc indica os animais tratados NMDA + QA não convulsionados e NQc indica os animais tratados com NMDA + QA convulsionados **A.** Fotografia representativa de “western blotting” do hipocampo de camundongos, n = 6. **B.** Quantificação da densidade ótica das bandas marcadas para a proteína Caspase-3 de amostras do hipocampo. Os valores representam média \pm erro padrão. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

4.3. AVALIAÇÃO DA GLUTATIONA TOTAL E DA ATIVIDADE DE SUAS ENZIMAS RELACIONADAS

Considerando que os níveis de GSH-t são considerados marcadores do estresse oxidativo (MAHER, 2005), o conteúdo de GSH-t foi avaliado no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e 24 horas após as convulsões induzidas pelo AQ.

Na Figura 10 observa-se que o tratamento com NMDA ou a infusão de AQ não provocaram nenhuma alteração nos níveis de GSH-t tanto no córtex como no hipocampo em comparação com o grupo controle (salina). Adicionalmente, os níveis de GSH-t total não estavam alterados entre os grupos não-convulsionado (NQnc) e convulsionado (NQc) (Figura 10).

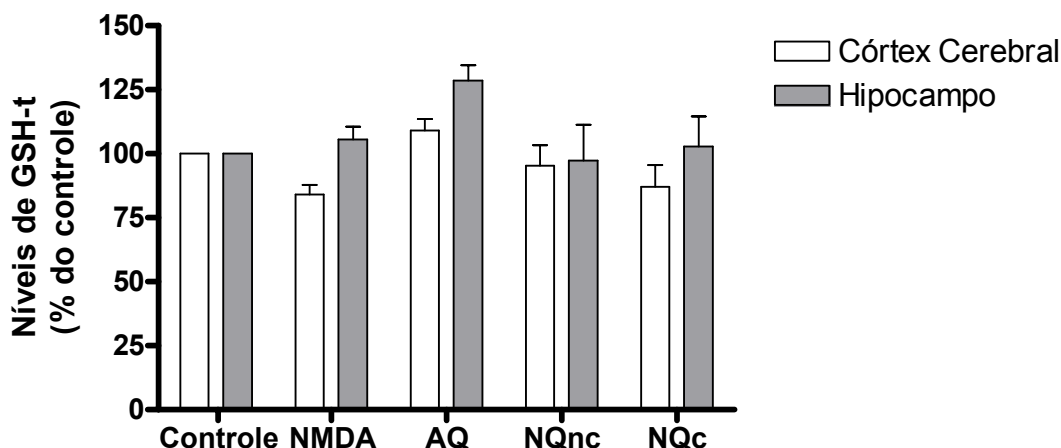


Figura 10. Avaliação dos níveis de glutathiona total (GSH-t) no pré-condicionamento com NMDA contra as convulsões induzidas pelo AQ no córtex cerebral e hipocampo de camundongos. Os animais foram tratados com veículo (salina, grupo controle) (n=7), ou NMDA (n = 8) (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v.) (n = 5) e foram observados por 10 minutos para a ocorrência de convulsões. NQnc indica os animais tratados NMDA + QA não convulsionados (n = 9) e NQc indica os animais tratados com NMDA + QA convulsionados (n = 9). Os valores estão apresentados como porcentagem do controle (100%) e representam media \pm erro padrão. Os níveis de GSH-t do grupo controle são $2,28 \pm 0,12$ $\mu\text{mol/g}$ tecido para o córtex cerebral e $2,05 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/g}$ tecido para o hipocampo. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

Como uma atividade aumentada da GPx foi demonstrada após o pré-condicionamento hipóxico (ARTHUR et al, 2004), a atividade da GPx foi avaliada no córtex e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA, assim como após a infusão i.c.v. de AQ.

Como pode ser observado na Figura 11, todos os camundongos tratados com AQ apresentaram uma diminuição significativa na atividade da GPx cortical quando comparados com os grupos controle e NMDA. Assim, nota-se que o pré-condicionamento com NMDA não aboliu a redução na atividade da GPx induzida pelo AQ no córtex cerebral mesmo nos animais que não apresentaram convulsões (grupo NQnc). No hipocampo, o grupo tratado com salina i.p. e AQ i.c.v. apresentou uma redução significativa na atividade da GPx em relação ao grupo controle. O pré-condicionamento com NMDA preveniu a diminuição induzida pelo AQ, o que pode ser considerado um efeito protetor.

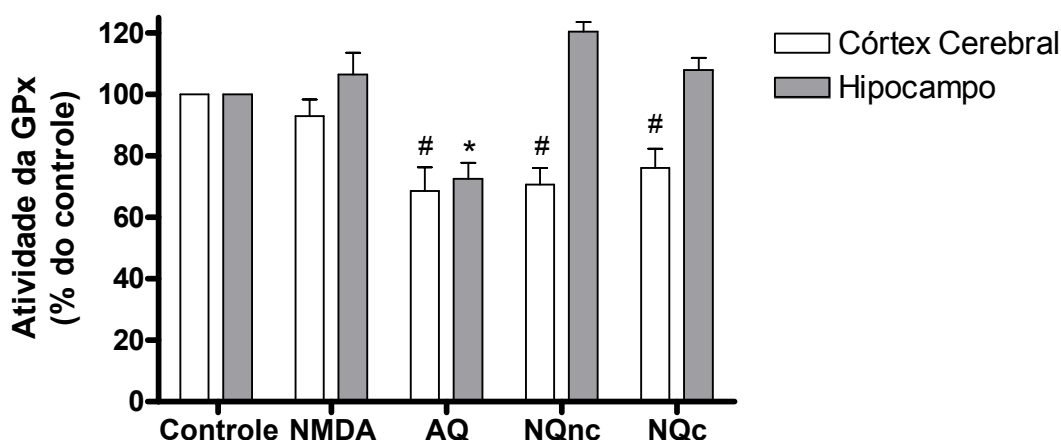


Figura 11. Atividade da Glutathione peroxidase (GPx) no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ. Os animais foram tratados com veículo (salina, grupo controle) (n=6), ou NMDA (n = 6) (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v.) (n = 5) e foram observados por 10 minutos para a ocorrência de convulsões. NQnc indica os animais tratados NMDA + QA não convulsionados (n = 7) e NQc indica os animais tratados com NMDA + QA que convulsionados (n = 6). Os valores estão apresentados como porcentagem do controle (100 %, $15,76 \pm 0,38$ nU/min/mg proteína para o córtex cerebral e $8,29 \pm 0,18$ nU/min/mg proteína para o hipocampo) e representam media \pm erro padrão.* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparado com os grupos controle e NMDA. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

A partir de demonstrações prévias de que o AQ é capaz de gerar produtos da peroxidação lipídica (YAN et al, 2005), e a GST é capaz de detoxificar tais compostos (MAHER, 2005), seguiu-se a análise dos efeitos do pré-condicionamento com NMDA e do AQ sobre a atividade da GST.

No córtex cerebral, observou-se que o pré-condicionamento com NMDA e a administração i.c.v. de AQ resultaram em um aumento na atividade da GST quando comparados com o grupo controle (Figura 12). Contudo, a associação do pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ preveniram este aumento tanto nos animais convulsionados (NQc) quanto nos não convulsionados (NQnc). No hipocampo, nenhuma alteração foi observada na atividade da GST entre os grupos apesar dos tratamentos ou da ocorrência de convulsões (Figura 12).

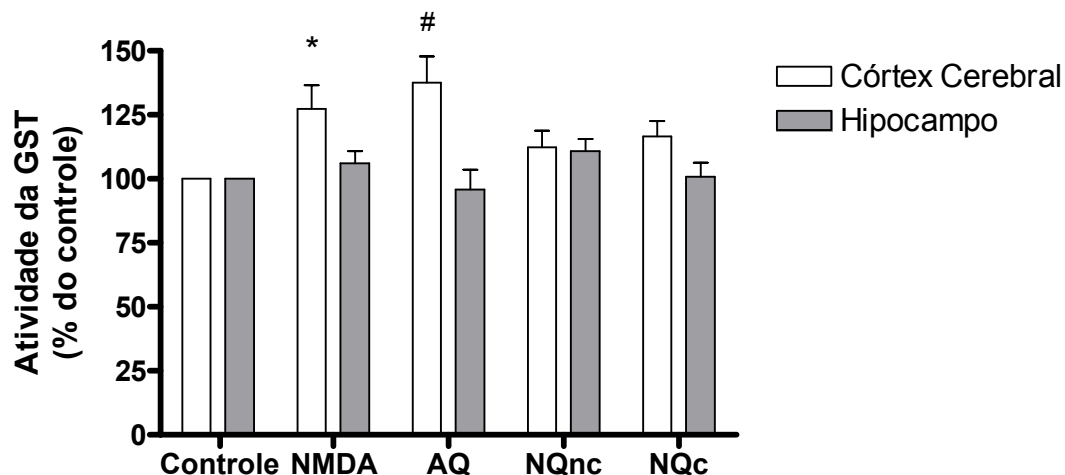


Figura 12. Atividade da Glutathione S-transferase (GST) no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ. Os animais foram tratados com veículo (salina, grupo controle) (n=6), ou NMDA (n = 9) (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v.) (n = 5) e foram observados por 10 minutos para a ocorrência de convulsões. NQnc indica os animais tratados NMDA + QA não convulsionados (n = 10) e NQc indica os animais tratados com NMDA + QA que convulsionados (n = 8). Os valores estão apresentados como porcentagem do controle (100 %, 76,1 ± 0,57 nU/min/mg proteína para o córtex cerebral e 134,2 ± 1,12 nU/min/mg proteína para o hipocampo) e representam media ± erro padrão. * p < 0,05 comparado com o grupo controle. # p < 0,05 comparado com os grupos controle e NQnc. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

A glutationa dissulfeto (GSSG), gerada a partir da atividade da GPx em resposta ao estresse oxidativo, é reduzida novamente a GSH pela GR em uma reação dependente de NADPH, o qual é originado pela atividade da G6PDH. O pré-condicionamento com NMDA associado ou não com a infusão de AQ não provocou nenhuma alteração significativa em ambas as enzimas GR (Figura 13) e G6PDH (Figura 14), tanto no córtex como no hipocampo em comparação ao grupo controle.

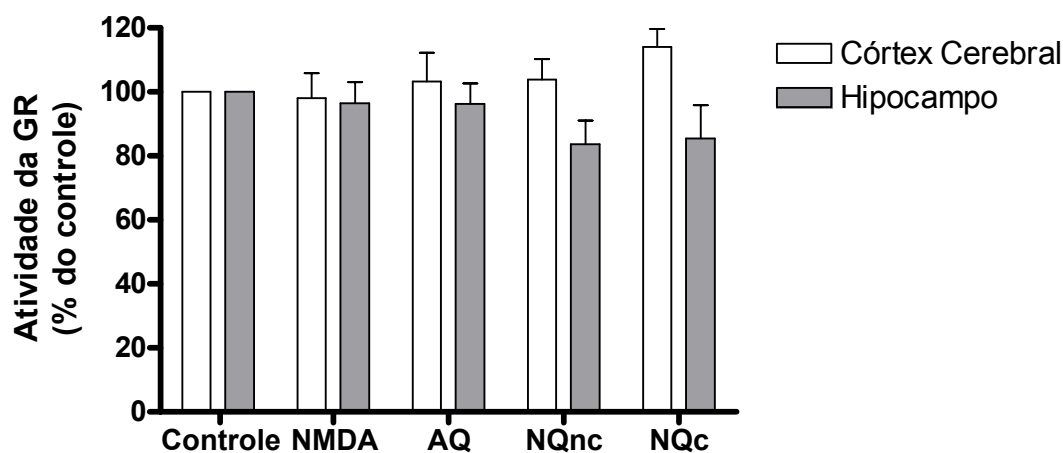


Figura 13. Atividade da Glutathione redutase (GR) no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ. Os animais foram tratados com veículo (salina, grupo controle) (n=6), ou NMDA (n = 6) (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v.) (n = 6) e foram observados por 10 minutos para a ocorrência de convulsões. NQnc indica os animais tratados NMDA + QA não convulsionados (n = 7) e NQc indica os animais tratados com NMDA + QA que convulsionados (n = 6). Os valores estão apresentados como porcentagem do controle (100 %, $28,6 \pm 0,6$ nU/min/mg proteína para o córtex cerebral e $34,4 \pm 0,5$ nU/min/mg proteína

para o hipocampo) e representam media \pm erro padrão. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

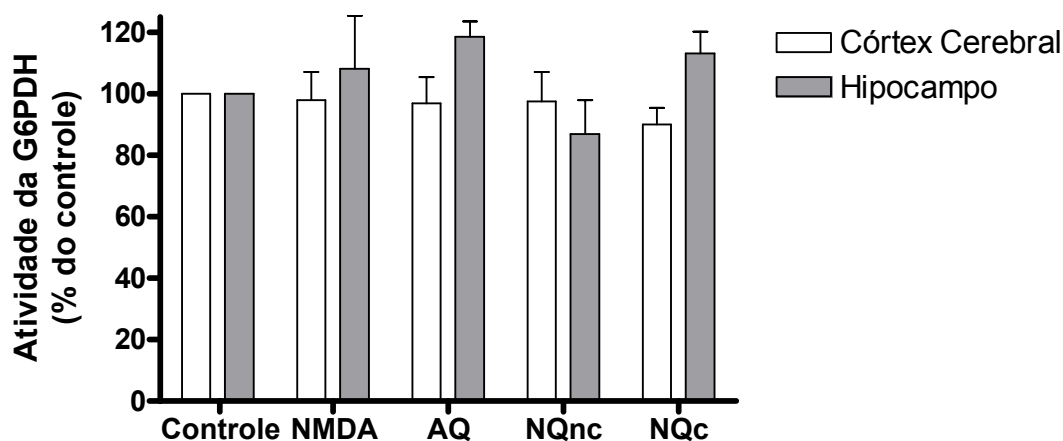


Figura 14. Atividade da Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no córtex cerebral e hipocampo de camundongos após o pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ. Os animais foram tratados com veículo (salina, grupo controle) (n=6), ou NMDA (n = 6) (75 mg/kg, i.p.) 24 h antes da infusão de AQ (36,8 nmóis, i.c.v.) (n = 6) e foram observados por 10 minutos para a ocorrência de convulsões. NQnc indica os animais tratados NMDA + QA não convulsionados (n = 8) e NQc indica os animais tratados com NMDA + QA que convulsionados (n = 8). Os valores estão apresentados como porcentagem do controle (100 %, 13,45 \pm 0,19 nU/min/mg proteína para o córtex cerebral e 7,02 \pm 0,22 nU/min/mg proteína para o hipocampo) e representam media \pm erro padrão. (ANOVA seguido do teste de Duncan).

5. DISCUSSÃO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos e a ativação de seus receptores está envolvida em processos fisiológicos e patológicos. A ativação excessiva dos NMDAR pode induzir morte celular tanto por apoptose como por necrose (NICHOLLS & BUDD, 1998; ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003). Demonstrou-se que a injeção intra-hipocampal de cainato em ratos provoca morte celular com características necróticas e apoptóticas (CHANG et al, 2005), assim como o glutamato promove morte celular com características apoptóticas em fatias de hipocampo (MOLZ et al, 2005).

O AQ é um agonista dos NMDAR envolvido com a toxicidade celular através da geração de radicais livres, distúrbio da transmissão glutamatérgica e está associado a diversas condições patológicas do SNC (STONE & DARLINGTON, 2002). Neste estudo, avaliou-se a fragmentação do DNA, um parâmetro indicador de morte celular por apoptose, para caracterizar o tipo de morte celular induzida pela infusão de AQ i.c.v. em camundongos.

A curva de tempo da análise da fragmentação do DNA no córtex cerebral (Figura 1) e hipocampo (Figura 2) após as convulsões induzidas pelo AQ não revelou fragmentação do DNA. Em outro estudo, foi demonstrado que a injeção i.c.v. de AQ aumenta significativamente a captação de iodeto de propídio a partir de 4h até 72 h após o insulto com AQ (GANZELLA et al, 2006). O iodeto de propídio é um composto polar que entra

somente nas células com a membrana plasmática rompida (WROBEL et al, 1996). Estes resultados de fragmentação do DNA e captação de iodeto de propídio sugerem uma morte celular por necrose após as convulsões induzidas pelo AQ.

As proteases caspases são clivadas e ativadas quando o processo de morte por apoptose é desencadeado. Nos experimentos de imunodeteção da caspase-3, não se observou um aumento na detecção do fragmento de 17 kDa, que representa a forma ativada da caspase-3, tanto no córtex cerebral (Figura 8) como no hipocampo (Figura 9) após o tratamento com AQ em relação ao grupo controle. Além disso, o tratamento com AQ não promoveu diminuição no conteúdo de GSH nas estruturas avaliadas (Figura 10), considerando-se que a depleção da GSH celular está envolvida no desencadeamento de cascatas de morte celular por apoptose (SAVITZ & ROSENBAUM, 1998). Assim, as ausências de fragmentação de DNA e detecção do fragmento de 17 kDa, além da falta de alterações nos níveis de GSH-t sugerem que a injeção de AQ i.c.v. promova morte celular por um processo necrótico no córtex cerebral e hipocampo. Por outro lado, a injeção de AQ intra-estriatal desencadeia uma cascata de morte celular apoptótica com dano ao DNA e ativação da caspase 3 nos neurônios espinhosos médios do estriado (QIN et al, 1999; SENATOROV et al, 2004).

Visto que a excitotoxicidade glutamatérgica está envolvida em diversos modelos de dano cerebral, como a isquemia, tanto *in vitro* como *in vivo*, a atenuação desse processo de injúria celular poderia estar envolvido com o estado de tolerância cerebral induzido pelo pré-condicionamento. De fato, diversos modelos de pré-condicionamento demonstraram a participação do sistema glutamatérgico na geração da tolerância cerebral (GIDDAY, 2006).

Em modelos de pré-condicionamento isquêmico, o tratamento com MK-801 previne o efeito neuroprotetor de uma isquemia breve, no entanto, o tratamento com antagonistas

dos receptores AMPA não influenciam a neuroproteção, salientando, desse modo, o envolvimento do sistema glutamatérgico, especialmente dos NMDAR (BOND et al, 1999). Além disso, o pré-condicionamento isquêmico e hipóxico promovem um aumento na expressão de GLT-1 e GLAST nas áreas cerebrais protegidas (CIMAROSTI et al, 2005; ZHANG et al, 2007). Assim, o sistema glutamatérgico participa do pré-condicionamento cerebral tanto na sua fase de indução, através dos NMDAR, como também na fase de efetuação, por meio dos transportadores de glutamato que regulam os níveis extracelular de glutamato.

Os receptores adenosinérgicos influenciam o pré-condicionamento com NMDA. Boeck e cols (2004) demonstraram que a administração de um antagonista dos receptores A_1 reverte a proteção promovida pelo pré-condicionamento com NMDA contra convulsões induzidas pelo AQ. No entanto, esse antagonista de receptores A_1 não aboliu a proteção celular do pré-condicionamento contra o dano citotóxico no hipocampo causado pelo AQ (BOECK et al 2004). No mesmo estudo, verificou-se que o N-ciclopentiladenosina, um agonista de receptor de adenosina do sub-tipo A_1 , não alterou a incidência de convulsões, como também não afetou o dano celular induzido pelo AQ.

Além disso, em cultura de neurônios granulares também se demonstrou a participação dos receptores adenosinérgicos e receptores do fator neurotrófico derivado do cérebro. A administração de antagonistas do receptor A_1 , mas não de antagonistas do receptor A_{2A} , reverte a neuroproteção mediada pelo pré-condicionamento com NMDA contra a morte celular induzida por glutamato (BOECK et al 2005b). Zhu e cols. (2005) observaram que o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA era atenuado pela co-administração de um inibidor da atividade dos receptores do fator neurotrófico

derivado do cérebro do tipo TrkB. Esses dados sugerem uma importante interação entre o sistema adésinérgico e as neurotrofinas com o pré-condicionamento com NMDA.

Além da atenuação de processos de lesão celular, o pré-condicionamento promoveria proteção neural através do aprimoramento dos processos de reparo celular. Sabe-se que a isquemia e o período de reperfusão são acompanhados de dano oxidativo ao DNA que precede a morte celular. Assim, entre estes, os processos de reparo endógeno do DNA poderiam ser um dos mecanismos potencializados pelo pré-condicionamento cerebral.

No presente estudo, avaliou-se a análise da fragmentação do DNA após o pré-condicionamento com NMDA. Os resultados não revelaram fragmentação do DNA tanto no córtex cerebral (Figura 6) como no hipocampo (Figura 7). Assim, a dose sub-convulsivante de NMDA utilizada não causou dano ao DNA, resultado semelhante encontrado na análise da fragmentação 24 h após as convulsões com AQ (BOECK et al, 2005a). Estudos com pré-condicionamento isquêmico também demonstraram que o estímulo pré-condicionante não causa dano ao DNA, e além disso, previnem a fragmentação do mesmo induzida por uma isquemia letal (SUGAWARA et al, 2001). No mesmo estudo, os autores demonstraram que a proteção neural após o pré-condicionamento isquêmico estava acompanhado de um aumento na expressão da proteína Ku 70 nas áreas protegidas. A proteína Ku 70 é uma componente da maquinaria protéica envolvida no reparo do DNA. Esta proteína se une às fitas danificadas de DNA e iniciam, assim, o processo de reparo do mesmo. Estes resultados sugerem que os mecanismos de reparo do DNA podem estar envolvidos com a tolerância cerebral (SUGAWARA et al, 2001).

Os mecanismos moleculares responsáveis pela neuroproteção induzida pelo pré-condicionamento parecem envolver também tanto o aumento na expressão e atividade de

moléculas envolvidas na sobrevivência celular como a redução daquelas associadas à morte celular.

No presente estudo, avaliou-se a expressão da caspase-3 no córtex e hipocampo após o tratamento com NMDA e com AQ. Os resultados não revelaram nenhuma alteração na expressão da caspase-3 total (32 kDa, pró-caspase) tanto após o pré-condicionamento com NMDA e quanto com o tratamento com AQ. A avaliação do fragmento de 17 kDa, que representa a forma ativada da caspase-3, também não demonstrou alteração nos grupos tratados em relação ao controle, sugerindo que a ativação da caspase-3 não é essencial no pré-condicionamento com NMDA. No entanto, Qi e cols (2001) demonstraram uma diminuição na ativação da caspase-3 pelo pré-condicionamento isquêmico no prosencéfalo de camundongos. Por outro lado, em outros modelos de pré-condicionamento isquêmico, foram demonstrada a clivagem da caspase-3 e sua subsequente ativação durante um intervalo de tempo coincidente com o período de tolerância isquêmica (TANAKA et al, 2004; MCLAUGHLIN et al, 2005). Dessa forma, durante a tolerância cerebral a ativação da caspase-3 não é acompanhada de morte celular. Isso pode ser resultado da intervenção negativa do pré-condicionamento sobre um dos alvos da caspase-3 a DNase-ativada por caspase, uma deoxiribonuclease que cataliza a fragmentação do DNA, evitando assim a morte celular (TANAKA et al, 2004).

Em modelos de pré-condicionamento hipóxico, a expressão de outras proteínas pró-apoptóticas como a Bax encontra-se reduzida (RYBNIKOVA et al, 2006). A Bax, quando ativada por um insulto isquêmico, sofre uma alteração conformacional, se oligomeriza e se transloca para a mitocôndria, onde pode formar poros e resultar na liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais que ativam as caspases (LEBLANC, 2003). Do mesmo modo,

a proteína pró-apoptótica Bim sofre rápida degradação pelo sistema ubiquitina-proteossoma na aquisição de tolerância isquêmica (MELLER et al, 2006).

Além disso, a expressão aumentada das proteínas de choque térmico HSP 27 e HSP 72, ambas envolvidas com a proteção celular, podem contribuir para a tolerância cerebral induzida pelo pré-condicionamento (PLUMIER et al, 1997; MORI et al, 2000 VALENTIM et al, 2003). Outros dados de pré-condicionamento isquêmico demonstram um aumento na expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL. Neste mesmo modelo, foi demonstrado que a ativação da proteína de união do elemento de resposta ao AMP cíclico regula a expressão dessas proteínas durante a aquisição da tolerância cerebral (MELLER et al, 2005).

As enzimas antioxidantes também são candidatas em potencial como moléculas efetoras do pré-condicionamento cerebral (DANIELISOVA et al, 2005), como o promovido pelo NMDA contra convulsões induzidas pelo AQ, desde que aquelas poderiam combater os efeitos das ERO, as quais se sabe participar da excitotoxicidade promovida pelo AQ (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al, 2000; GANZELLA et al, 2006).

Visto que a GSH é o tiol não protéico mais abundante nas células, os níveis de GSH-t e a razão entre a glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) são considerados indicadores do estado redox celular e podem ser considerados como marcadores do estresse oxidativo (MAHER, 2005). Assim neste trabalho, com o intuito de elucidar as moléculas efetoras ativadas por uma dose sub-convulsivante de NMDA e os efeitos tóxicos do AQ, uma avaliação do sistema antioxidante da GSH foi realizada, desde que é amplamente demonstrado na literatura que os níveis celulares de GSH estão relacionados a sobrevivência ou morte celular (WULLNER et al, 1999; RIZZARDINI et al, 2003; SIMS et al, 2004).

Neste modelo, o pré-condicionamento com NMDA não provocou nenhuma alteração nos níveis de GSH-t, indicando que o pré-tratamento com NMDA não promoveu estresse oxidativo (Figura 10). De fato, este resultado não é surpreendente a partir de que não houve alterações nas atividades da GPx e GR nos animais pré-condicionados (Figura 11 e Figura 13). Estes resultados estão em desacordo com achados prévios *in vitro*, nos quais um aumento nos níveis de GSH são demonstrados (SINGH et al, 2006) após o tratamento com uma dose sub-tóxica de NMDA, apesar de que no presente trabalho a razão GSH/GSSG não foi avaliada. O AQ também não provocou nenhuma alteração nos níveis de GSH-t 24 h após sua infusão. Esta ausência de efeito do AQ sobre o conteúdo cortical e hipocampal de GSH poderia se atribuída ao fato de que os ERO gerados após a infusão de AQ i.c.v. estão aumentados 4 h depois do tratamento, mas retornam aos valores do grupo controle após 24 h. (GANZELLA et al, 2006). Cruz-Aguado e cols (2000) demonstraram uma diminuição de 30% no conteúdo estriatal de GSH, no entanto, sem alterações nos níveis de GSH no córtex e hipocampo.

Em relação às enzimas associadas a GSH, nenhuma alteração na atividade da GPx foi induzida pelo pré-condicionamento com NMDA (Figura 11), o que está de acordo com relatos prévios na literatura, nos quais outros estímulos pré-condicionantes foram utilizados, tais como isquemia (PUISIEUX et al, 2004) e depressão cortical alastrante (MITCHELL et al, 2001). Além disso, a atividade de outras enzimas antioxidantes como a Cu/Zn e Mn-superóxido dismutase não foram alteradas pelo pré-condicionamento com isquemia (PUISIEUX et al, 2004) ou com depressão cortical alastrante (MITCHELL et al, 2001). Apesar das atividades das enzimas antioxidantes não estarem alteradas no modelo de pré-condicionamento isquêmico, o pré-tratamento com ebselen, um composto antioxidante seleno-orgânico, ou com dimetiltiouréia, um neutralizante de radicais livres, aboliu a

neuroproteção, sugerindo assim a participação do estresse oxidativo no pré-condicionamento isquêmico. Por outro lado, uma dose sub-tóxica de NMDA acarretou no aumento da atividade da GPx e da Cu/Zn-superóxido dismutase em cultura de glioma C6 (SINGH et al, 2006) e neuroblastoma SHSY5Y (SINGH et al, 2005). O pré-condicionamento com hipóxia também aumentou a atividade da GPx, assim como, da Mn^{+2} -superóxido dismutase em cultura de neurônios corticais (ARTHUR et al, 2004).

Foi demonstrado que nas amostras do córtex cerebral de todos os grupos que receberam a infusão de AQ i.c.v. houve uma diminuição da atividade da GPx e que o pré-condicionamento com NMDA não foi efetivo em prevenir esses efeitos (Figura 11). Entretanto, tal prevenção foi observada no hipocampo, onde o pré-condicionamento aboliu a diminuição na atividade da GPx induzida pelo AQ. Estudos prévios demonstraram que uma única injeção intra-estriatal de AQ aumenta a peroxidação lipídica, no entanto, sem provocar alterações na atividade da GPx num período de 2 h (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al, 2000; SANTAMARÍA et al, 2003) e 6 semanas (CRUZ-AGUADO et al, 2000) após a lesão com AQ.

Diferentemente das outras enzimas avaliadas, o pré-condicionamento com NMDA induziu um aumento na atividade da GST no córtex cerebral (Figura 12). O aumento da atividade da GST induzido pelo pré-condicionamento com NMDA poderia ser devido à geração de peróxidos lipídicos gerados pela ativação dos NMDAR. O aumento na atividade da GST cortical após a injeção de AQ poderia neutralizar produtos da peroxidação lipídica (MAHER, 2005), os quais sabe-se que podem ser gerados a partir da estimulação excessiva dos NMDAR (BABU et al, 1997). Estudos anteriores também demonstraram um aumento na atividade da GST no estriado após o tratamento com AQ (CRUZ-AGUADO et al, 2000). Nenhuma alteração na atividade da GST foi observada nos animais pré-tratados com

NMDA seguido pela infusão de AQ independentemente da ocorrência ou não de convulsões.

A atividade da GR permaneceu inalterada no córtex cerebral e hipocampo dos camundongos expostos ao pré-condicionamento com NMDA, assim como, daqueles expostos ao pré-condicionamento seguida da infusão de AQ (Figura 13). Estes dados estão em desacordo com resultados prévios em culturas de neurônios corticais expostas ao pré-condicionamento hipóxico, onde um aumento na atividade da GR foi observado e, adicionalmente, níveis significativamente mais baixos de íons superóxido e peróxido de hidrogênio (ARTHUR et al, 2004). No presente trabalho, também foi demonstrado que o AQ não exerce nenhum efeito sobre a atividade da GR (Figura 13). Cruz-Aguado e cols (2000), do mesmo modo, não observaram alterações na atividade da GR no córtex frontal e hipocampo após injeção intra-estriatal de AQ, apesar de que uma diminuição na atividade da GR foi observada no estriado que recebeu a injeção de AQ.

A atividade da G6PDH não foi previamente estudada em modelos de pré-condicionamento no SNC. No entanto, estudos com modelos de pré-condicionamento isquêmico do miocárdio de ratos demonstraram que não ocorre alteração na atividade da G6PDH (TURRENS et al, 1992). No presente trabalho, também foi demonstrado que a atividade da G6PDH não foi alterada tanto pelo pré-condicionamento com NMDA como pela infusão de AQ (Figura 14). Por outro lado, em um modelo de pré-condicionamento com ozônio, este foi efetivo em prevenir a diminuição na atividade da G6PDH no fígado induzida pelo CCl₄ (LEÓN et al, 1998).

Dessa forma, o presente estudo demonstra que o tratamento com dose sub-tóxica de NMDA induz proteção contra as convulsões induzidas pelo AQ e o sistema antioxidante da

GSH pode não estar diretamente associado aos efetores responsáveis pela tolerância cerebral induzida pelo pré-condicionamento com NMDA. Foi demonstrado que o pré-condicionamento com NMDA previne a redução da atividade da GPx induzida pelo AQ, mas somente no hipocampo. Entretanto, o pré-condicionamento com NMDA não provocou alterações nos níveis de GSH-t, na atividade da GR e da G6PDH. Apesar de que, baseado nestes resultados, não se pode descartar que um estresse oxidativo moderado poderia ativar cascatas de sinalização que estariam envolvidas na indução da tolerância cerebral, o que não foi avaliado no presente estudo. Assim, a identificação dos mecanismos intrínsecos de proteção celular permanece crucial no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que parecem estar sobrepostos entre os diferentes métodos de pré-condicionamento, e podem representar um tratamento para desordens agudas e crônicas do cérebro, como a isquemia e a epilepsia.

6. CONCLUSÕES

- A infusão de AQ não promoveu a fragmentação do DNA no córtex cerebral e no hipocampo após 8, 24, 48, 72 e 96 h, caracterizando assim morte celular necrótica.
- O pré-condicionamento com NMDA não promoveu fragmentação do DNA no córtex cerebral e hipocampo 48 após a infusão de AQ.
- O pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ não provocaram nenhuma alteração significativa na expressão da pró-caspase-3 e na caspase-3 ativada tanto no córtex cerebral como no hipocampo.
- O pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ não alteraram o conteúdo de glutatona total no córtex e hipocampo dos animais.
- A infusão de AQ promoveu uma diminuição significativa na atividade da GPx no córtex cerebral e no hipocampo. No entanto, somente no hipocampo o pré-condicionamento preveniu essa diminuição, o que pode ser considerado um efeito neuroprotetor.
- O pré-condicionamento com NMDA e a administração i.c.v. de AQ resultaram em um aumento na atividade da GST no córtex cerebral. No entanto, a associação do pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ preveniram este aumento tanto nos animais convulsionados quanto nos não convulsionados. Não houve alteração da atividade da GST no hipocampo.
- O pré-condicionamento com NMDA e a infusão de AQ não provocaram nenhuma alteração significativa na atividade da GR e da G6PDH tanto no córtex como no hipocampo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADIAN, G.; JU, W.; LIU, L.; WYSZYNSKI, M.; LEE, S.H.; DUNAH, A.W.; TAGHIBIGLOU, C.; WANG, Y.; LU, J.; WONG, T.P.; SHENG, M.; WANG, Y.T. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. **EMBO J.**, v. 23, p. 1040-1050, 2004.
- ANKRACRONA, M. D.; DYPBUKT, J. M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B. ORRENIUS, S.; LIPTON, S.A.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v. 15, p. 961-973, 1995.
- ARTHUR, P. G.; LIM, S.C.; MELONI, B. P.; MUNNS, S. E.; CHAN, A.; KNUCKEY, N. W. The protective effect of hypoxic preconditioning on cortical neuronal cultures is associated with increases in the activity of several antioxidant enzymes. **Brain Res.** v. 1017, p. 146-154, 2004.
- ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular Mechanisms of Calcium-dependent neurodegeneration in Excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 34, p. 325-337, 2003.
- ASHE, P. C.; BERRY, M. D. Apoptotic signaling cascades. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.27, p. 199-214, 2003.

BABU, G. N.; BAWARI, M. Single microinjection of L-glutamate induces oxidative stress in discrete regions of rat brain. **Biochem Mol Biol Int.**, v. 43, p. 1207-1217, 1997.

BOECK, C. GANZELLA, M.; LOTTERMANN, A.; VENDITE, D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. **Epilepsia**, v.45, p. 745-750, 2004.

BOECK, C. GANZELLA, M.; DECKER, H.; VENDITE, D.; LEAL, R.B.; TASCA, C.I. NMDA preconditioning protects mice against necrotic cellular death induced by quinolinic acid. **J Neurochem.**, v. 94, p.48, 2005a.

BOECK, C.; KROTH, E.; BRONZATTO, M.; VENDITE, D. Adenosine receptors cooperate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. **Neuropharmacology**, v.49, p.17-24, 2005b.

BOND, A.; LODGE, D. HICKS, C. A.; WARD, M.A.; ONEILL, M.J. NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. **Eur J Pharmacol.**, v. 380, p. 91-99, 1999.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D. ANKRACRONA, M. D.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 7162-7166, 1995.

CHANG, A.Y.; WANG, C.H.; CHIU, T.H.; CHI, J.W.; CHEN, C.F.; HO, L.T.; LIN, A.M.Y. Hypoxic preconditioning attenuated in kainic acid-induced neurotoxicity in rat hippocampus. **Exp Neurol.**, v. 195, p. 40-48, 2005.

CIMAROSTI, H.; JONES, N.M.; O'SHEA, R.D.; POW, D.V.; SALBEGO, C.; BEART, P.M. Hypoxic preconditioning in neonatal rat brain involves regulation of excitatory amino acid transporter 2 and estrogen receptor alpha. **Neurosci Lett.**, v. 385, p. 52-57, 2005.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem J.**, v.326, p. 1-16, 1997.

CRUZ-AGUADO, R.; FRANCIS-TURNER, L.; DIAZ, C.M.; ANTUNEZ, I. Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. **Neurochem Int.** v. 37, p. 53-60, 2000.

CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Curr Opin Neurobiol.**, v.11, p.327-335, 2001.

DICKINSON, D.A., FORMAN, H.J. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. **Ann NY Acad Sci.** v. 973, p. 488-504, 2002.

DIRNAGL, U.; SIMON, R.P.; HALLENBECK, J. M. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. **Trends Neurosci.** v.26, p. 248-254, 2003.

EMERIT, J.; EDEAS, M. BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress.

Biomed Pharmacother. v. 58, p.39-46, 2004.

GANZELLA, M.; JARDIM F.M., BOECK, C.R.; VENDITE, D. Time course of oxidative events in the hippocampus following intracerebroventricular infusion of quinolinic acid in mice. **Neurosci Res.** v. 55, p. 397-402, 2006.

GIBB, A. J. NMDA receptor subunit gating – uncovered. **Trends Neurosci**, v.27, p.7-10, 2004.

GIDDAY, J. M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. **Nat Rev Neurosci.** v. 7, p. 437-48, 2006.

GREWER, C.; RAUEN, T. Electrogenic glutamate transporters in the CNS: molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. **J Membr Biol.** v. 1, p. 1-20, 2005.

GUBELLINI, P.; PISANI, A.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G.; CALABRESI, P.
Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. **Prog Neurobiol.**, v. 74, p. 271-300, 2004.

GRÜTTER, M. G. Caspases: key players in programmed cell death. **Curr Opin Struct Biol.** v.10, p.649–655, 2000.

HEYES M.P., RUBINOW D., LANE C., MARKEY S. P. Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. **Ann Neurol.** v. 26, p. 275–277, 1989.

HEYES, M.P.; WYLER, A.R.; DEVINSKY, O.; YERGEY, J.A.; MARKEY, S.P.; NADI, N.S. Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures. **Epilepsia**, v.31, p. 172-177, 1990.

HICKEY, M. A.; CHESSELET, M. F. Apoptosis in Huntington's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v. 27,p. 255-265, 2003.

HUETTNER, J. E. Kainate receptors and synaptic transmission. **Prog Neurobiol**, v.70, p. 387–407, 2003.

HYND, M. R.; SCOTT, H. L.; DODD, P. R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochem Int.**, v. 45, p. 583-595, 2004.

ISHIMARU, M.J.; IKONOMIDOU, C.; TENKOVA, T.I.; DER, T.C.; DIKRANIAN, K.; SEMSA, M.A.; OLNEY, J.W. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **J Comp Neurol.**, v. 408, p.461-476, 1999.

- JANOFF, A. Alterations in lysosomes (intracellular enzymes) during shock; effects of preconditioning (tolerance) and protective drugs. **Int Anesthesiol Clin.** v.2, p. 251–259, 1964.
- KANAI, Y.; HEDIGER, M. A. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. **Eur J Pharmacol.** v. 479, p. 237-247, 2003.
- KITAGAWA, K.; MATSUMOTO, M.; KUWABARA, k.; TAGAYA, M. OHTSUKI, T.; HATA, R.; UEDA, H.; HANDA,N.; KIMURA, K.; KAMADA,T.“Ischemic tolerance” phenomenon detected in various brain regions. **Brain Res.**, v. 561, p. 203-11, 1991.
- LAPIN, I. P. Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. **J Neural Transm.**, v.42, p.37-43, 1978.
- LEBLANC, A. C. Natural cellular inhibitors of caspases. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 27, p. 215-229, 2003
- LEÓN, O.S.; MENÉNDEZ, S.; MERINO, N.; CASTILLO, R.; SAM, S.; PÉREZ, L.; CRUZ, E.; BOCCI, V. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. **Mediators of Inflammation**, v. 7, p. 289-294, 1998.
- LERMA, J. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. **Nat Rev Neurosci.**, v. 4, p. 481-495, 2003.

LIPTON, S. A. Failures and Successes of NMDA Receptor Antagonists: Molecular Basis for the Use of Open-Channel Blockers like Memantine in the Treatment of Acute and Chronic Neurologic Insults. **NeuroRx**, v.1, p. 101-110, 2004.

LUCAS, D.R.; NEWHOUSE, J.P. The toxic effect of sodium l-glutamate on the inner layers of the retina, **Arch Ophthalmol**. v.58, p. 193–201, 1957.

LYNCH D.R.; GUTTMANN, R. P. Excitotoxicity: perspectives based on NMDA receptor subtypes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 300, p. 717–723, 2002.

MADDEN, D. R. The Structure and Function of Glutamate Receptor Ion Channels. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, p. 91-101, 2002.

MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. **Ageing Res Rev**, v. 4, p. 288–314, 2005

MARK, L. P.; PROST, R. W.; ULMER, J. L.; SMITH, M. M.; DANIELS, D. L.; STROTTMANN, J. M.; BROWN, W. D.; HACEIN-BEY, L. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. **Am J Neuroradiol**, v. 22, p.1813-1824, 2001.

- MELLER, R.; MINAMI, M.; CAMERON, J.A.; IMPEY, S.; CHEN, D.; LAN, J.Q.; HENSHALL, D.C.; SIMON, R.P. CREB-mediated Bcl-2 protein expression after ischemic preconditioning. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 25, p. 234-246, 2005.
- MELLER, R.; CAMERON, J.A.; TORREY, D.J.; CLAYTON, C.E.; ORDONEZ, A.N.; HENSHALL, D.C.; MINAMI, M. SCHINDLER, M. SAUGSTAD, J.A.; SIMON, R.P. Rapid degradation of Bim by the ubiquitin-proteasome pathway mediates short-term ischemic tolerance in cultured neurons. **J Biol Chem.** v. 281, p. 7429-7436, 2006.
- MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis.**, v. 19, p. 151-167, 2004.
- METERE, A.; MALLOZZI, C.; MINETTI, M.; DOMENICI, M. R.; PEZZOLA, A.; POPOLI, P.; DI STASI, A. M. Quinolinic acid modulates the activity of src family kinases in rat striatum: in vivo and in vitro studies. **J Neurochem**, v. 97, p.1327–1336, 2006.
- MIAO, B.; YIN, X.H.; PEI, D.S.; ZHANG, Q.G.; ZHANG, G.Y. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation. **J. Biol Chem.** v. 280, p. 21693-21699, 2005.

- MITCHELL, K.; KARIKO, K.; HARRIS, V.A.; RANGEL, Y.; KELLER, J.M.; WELSH, F.A., 2001. Preconditioning with cortical spreading depression does not upregulate Cu/Zn-SOD or Mn-SOD in the cerebral cortex of rats. **Brain Res.** v. 96, p. 50-58, 2001.
- MOLZ, S.; DECKER, H.; OLIVEIRA, I.J.; SOUZA, D.O.; TASCA, C.I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. **Neurochem. Res.** v. 30, p. 83-89, 2005.
- MORI, T.; MURAMATSU, H.; MATSUI, T.; MCKEE, A.; ASANO, T. Possible role of superoxide anion in the development of neuronal tolerance following ischaemic preconditioning in rats. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** v. 26, p. 31-40, 2000.
- MORONI, F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. **Eur J Pharmacol**, v. 375, p. 87–100, 1999.
- MURRY, C.E.; JENNINGS, R.B.; REIMER, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation.** v. 74, p.1124-36, 1986.
- NAKAGAWA, T.; SATOH, M. Involvement of Glial Glutamate Transporters in morphine dependence. **Ann NY Acad Sci.**, v. 1025, p. 383-388, 2004.
- NAREDO, I V.; POEGGELER, B.; SANCHES, V. S.; CABALLERO,B.; ZAPICO, C.T.; GARCIA, O. A.; TOLIVIA, D.; COLUNGA, M. R.; MONTES, A. C. Melatonin

neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. **J Pineal Res.**, v. 39, p. 266-275, 2005.

NICHOLLS, D. G.; BUDD, S. L. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1366, p. 97-112, 1998.

NJALSSON, R. Glutathione synthetase deficiency. **Cell Mol Life Sci.** v. 62, p. 1938-1945, 2005.

OLIVEIRA, D. L.; HORN, J.F.; RODRIGUES, J.M.; FRIZZO, M.E.; MORIGUCHI, E.; SOUZA, D.O.; WOFCHUK, S. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. **Brain Res.**, v. 1018, p. 48-54, 2004.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**. v.164, p. 719-721, 1969.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 4, p. 552-565, 2003.

PETTMANN, B.; HENDERSON, C. E. Neuronal Cell Death. **Neuron**, v.20, p. 633-647, 1998.

PLUMIER, J.C.; DAVID, J.C.; ROBERTSON, H.A.; CURRIE, R.W. Cortical application of potassium chloride induces the low-molecular weight heat shock protein (Hsp27) in astrocytes. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 7, p. 781-790, 1997.

POPESCU, G.; AUERBACH, A. The NMDA Receptor Gating Machine: Lessons from Single Channels. **Neuroscientist**, v.10, p.192-198, 2004.

PORCHE, B. V.; BONVENTO, G.; TANAKA, K.; STEINER, P.; WELKER, E. CHATTON, J.; MAGISTRETTI, P.; PELLERIN, L. Glial and Glutamate Transporters mediate a Functional Metabolic Crosstalk between Neurons and Astrocytes in the Mouse Developing Cortex. **Neuron**, v. 37, p. 275-286, 2003.

PUISIEUX, F.; DEPLANQUE, D.; BULCKAEN, H.; MABOUDOU, P.; GELÉ, P.; LHERMITTE, M.; LEBUFFE, G.; BORDET, R. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. **Brain Res.** v. 1027, p. 30–37, 2004.

QI, S.; ZHAN, R.Z.; WU, C.; FUJIHARA, H. YAMAKURA, T.; BABA, H.; TAGA, K. SHIMOJI, K. Sublethal cerebral ischemia inhibits caspase-3 activation induced by subsequent prolonged ischemia in the C57Black/Crj6 strain mouse. **Neurosci. Lett.** v. 315, p. 133-136, 2001.

QIN, Z.H., CHEN, R.W., WANG, Y., NAKAI, M., CHUANG, D.M., CHASE, T.N., Nuclear factor kB nuclear translocation upregulates c-Myc and p53 expression during

NMDA receptor-mediated apoptosis in rat striatum. **J. Neurosci.** v.19, p.4023-4040, 1999.

RALEVIC, V. ;BURNSTOCK G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v.50, p. 413-492, 1998.

REIMER, K. A.; MURRY, C. E.; YAMASAWA, I.; HILL, M. L.; JENNINGS, R. B. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. **Am J Physiol.**, v.251, p. 1306-1315, 1986.

REJDAK, R.; REJDAK, K.; SIEKLUCKA,-DZIUBA, M.; STELMASIAK, Z.; GIEB, P. Brain tolerance and preconditioning. **Pol J Pharmacol.**, v. 53, p. 73-79, 2001.

SAMOILOV, M. O.; LAZAREVICH, E. V.; SEMENOV, D.G.; MOKRUSHIN, A.A.; TYULKOVA, E.I.; ROMANOVISKII, D.Y.; MILYKOVA, E.A.; DUDKIN, K.N. The adaptive effects of hypoxic preconditioning of brain neurons. **Neurosci Behav Physiol.**, v. 33, p. 1-11, 2003.

SANTAMARÍA, A.; SALVATIERRA-SANCHEZ, R.; VAZQUEZ-ROMAN, B.; SANTIAGO-LOPEZ, D.; VILLEDA-HERNÁNDEZ, J.; GALVAN-ARZATE, S.; JIMENEZ-CAPDEVILLE, M. E.; ALI, S.F. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. **J Neurochem.**, v.86, p. 479–488, 2003.

SASTRY, P.S.; RAO, K.S. Apoptosis and the nervous system. **J. Neurochem.** v. 74, p. 1-20, 2000.

SAVITZ, S. I; ROSENBAUM, D. M. Apoptosis in neurological diseases. **Neurosurgery**, v. 42, p. 535-574, 1998.

SCHMIDT, A.P., LARA, D.R., MARAHIN, J.F., PERLA, A.S, SOUZA, D.O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Res.**, v. 864, p. 40-43, 2000.

SCHORGE, S.; COLQUHOUN, D. Studies of NMDA Receptor Function and Stoichiometry with Truncated and Tandem Subunits. **J Neurosci.**, v. 23, p. 1151–1158, 2003.

SCHWARCZ, R.; PELLICCIARI, R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 303, p. 1-10, 2002.

SCOTT, Derek B.; BLANPIED, Thomas A., EHLERS, Michael D. Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXRmediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. **Neuropharmacology**, v. 45, p. 755–767, 2003.

SENATOROV, V.V.; REN, M; KANAI, H.; WEI, H.; CHUANG, D.M. Short-term lithium treatment promotes neuronal survival and proliferation in rat striatum with quinolinic

acid, an excitotoxic model of Huntington's disease. **Mol Psychiatry**, v. 4, p. 371-385, 2004.

SEO, Y. J.; LEE, J.W.; LEE, E.H.; LEE, H.K.; KIM, H.W.; KIM, Y.H. Role of glutathione in the adaptive tolerance to H₂O₂. **Free Radic Biol Med**. v.37, p. 1272-1281, 2004.

SHALLER, B; GRAF, R. Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention? **J Neurol.**, v. 249, p.1503-1511, 2002.

SHIGERI, Y.; SEAL, R.; SHIMAMOTO, K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. **Brain Res Rev.**, v. 45, p. 250-265, 2004.

SIMS, N.R.; NILSSON, M.; MUYDERMAN, H. Mitochondrial Glutathione: A Modulator of Brain Cell Death. **J Bioenerg Biomembr**. v. 36, p. 329-333, 2004.

SINGH, J., KAUR, G. Neuroprotection mediated by subtoxic dose of NMDA in SH-SY5Y neuroblastoma cultures: Activity-dependent regulation of PSA-NCAM expression. **Brain Res Mol Brain Res**. v. 137, p. 223 – 234, 2005.

SINGH, J.; KAUR, G. HSP70 induction and oxidative stress protection mediated by a subtoxic dose of NMDA in the retinoic acid-differentiated C6 glioma cell line. **Brain Res Bull**. v. 69, p. 37–47, 2006.

STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S. Properties of the caspases. **Biochim Biophys**

Acta, v. 1387, p. 17-31, 1998.

STONE, T. W. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. **Prog Neurobiol**, v. 64, p. 185–218, 2001.

STONE, T. W.; ADDAE, J. I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **Eur J Pharmacol**, v. 447, p. 285– 296, 2002.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous Kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov**, v.1, p. 609-620, 2002.

STONE, T.W., PERKINS, M.N.,. Quinolinic acid: a potent, endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. **Eur J Pharmacol**, v. 72, p. 411–412, 1981.

SUGAWARA, T.; NOSHITA, N.; LEWÉN, A.; KIM, G.W.; CHAN, P.H. Neuronal expression of the DNA repair protein Ku 70 after ischemic preconditioning corresponds to tolerance to global cerebral ischemia. **Stroke**, v. 32, p. 2388-2393, 2001.

SWAIN, J. L.; SABINA, R.L.; HINES, J.J.; GREENFIELD, J.C.; HOLMES, E.W. Repetitive episodes of brief ischaemia (12 min) do not produce a cumulative depletion of high energy phosphate compounds. **Cardiovasc Res**. v. 18, p. 264-269, 1984.

SWANSON, C.J.; BURES, M.; JOHNSON, M. P; LINDEN, A.; MONN, J. A; SCHOEPP, D. D. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nat Rev Drug Discov.**, v.4, p. 131-144, 2005.

TAKAGI, N.; SASAKAWA, K.; BESSHOH, S.; MIYAKE, Takagi K., TAKEO, S. Transient ischemia enhances tyrosine phosphorylation and binding of the NMDA receptor to the Src homology 2 domain of phosphatidylinositol 3-kinase in the rat hippocampus. **J Neurochem**, v. 84, p. 67-76, 2003.

TAN, S., SCHUBERT, D., MAHER, P. Oxytosis: A novel form of programmed cell death. **Curr Top Med Chem.** v. 1, p. 497-506, 2001.

TANAKA, H.; YOKOTA, H.; JOVER, T.; CAPPuccio, I.; CALDERONE, A.; SIMIONESCU, M.; BENNETT, M.V.L.; ZUKIN, R.S. Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation. **J Neurosci.**v. 24, p. 2750–2759, 2004.

TAVARES, R. G.; TASCA, C. I.; SANTOS, C.; WAGNER. M.; SOUZA, D. O.; DUTRA-FILHO, C. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. **Neuroreport**, v.11, p. 249-253, 2000.

TAVARES, R. G.; TASCA, C. I.; SANTOS, C.; ALVES, L.B.; PORCIUNCULA, L.O.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate

release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. **Neurochem Int.**, v.40, p. 621-627, 2002.

TAVARES, T.G.; SCHMIDT, A.P.; ABUD, J.; TASCA, C.I.; SOUZA, D.O. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. **Neurochem Res.**, v. 30, p. 439-444, 2005.

TURRENS, J.F.; THORNTON, J.; BARNARD, M.L.; SNYDER, S.; LIU, G. DOWNEY, J.M. Protection from reperfusion injury by preconditioning hearts does not involve increased antioxidant defenses. **Am J Physiol.** v. 262, p.585-589, 1992.

VALENTIM, L.M.; RODNIGHT, R.; GEYER, A.B.; HORN, A.P.; TAVARES, A.; CIMAROSTI, H.; NETTO, C.A.; SALBEGO, C.G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience** v. 118, p. 379-386, 2003.

XIA, Z.; STORM, D. R. The Role of Calmodulin as a Signal Integrator for Synaptic Plasticity. **Nat Rev Neurosci**, v.6, p. 267-276, 2005.

WANG, W.; BALLTORI, N. Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. **Pharmacol Rev**, v. 50, p. 332-355, 1998.

WARING, P. Redox Active calcium ion channels and cell death. **Arch Biochem Biophys**, v. 434, p. 33-42, 2005.

WAXMAN, E. A.; LYNCH, D. R. N-methyl-D-aspartate Receptor Subtypes: Multiple Roles in Excitotoxicity and Neurological Disease. **Neuroscientist**, v.11, p.37-49, 2005.

WROBEL, K.; CLAUDIO, E.; SEGADE, F.; RAMOS, S.; LAZO, P.S. Measurement of cytotoxicity by propidium iodide staining of target cell DNA. Application to the quantification of murine TNF-alpha. **J Immunol Methods**. v.189, p.243-249, 1996.

YAN, E.; CASTILLO-MELÉNDEZ, M.; SMYTHE, G.; WALKER, D. Quinolinic acid promotes albumin deposition in purkinje cell, astrocytic activation and lipid peroxidation in fetal brain. **Neuroscience**. v. 134, p. 867-875, 2005.

ZHANG, M.; LI, W.B.; GENG, J.X.; LI, Q.J.; SUN, X.C.; XIAN, X.H.; QI, J.; LI, S.Q. The upregulation of glial glutamate transporter-1 participates in the induction of brain ischemic tolerance in rats. **J Cereb Blood Flow Metab**. v. 27, 2007.